



**Universidade de  
Aveiro 2008**

Departamento de Engenharia Mecânica

**CARLOS MIGUEL  
DOMINGUES MOTA**

**SISTEMA DE BIOEXTRUSÃO PARA A ENGENHARIA  
DE TECIDOS**



**CARLOS MIGUEL  
DOMINGUES MOTA**

**SISTEMA DE BIOEXTRUSÃO PARA A ENGENHARIA  
DE TECIDOS**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica, realizada sob a orientação científica do Doutor José António de Oliveira Simões, Professor Associado com Agregação do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade de Aveiro e do Doutor Paulo Jorge da Silva Bártolo, Professor Coordenador do Departamento de Engenharia Mecânica do Instituto Politécnico de Leiria.

Dedico este trabalho aos meus pais Adélio e Adélia e à minha namorada Ana pelo incansável apoio.

## **O júri**

Presidente

**Prof. Francisco José Malheiro Queirós de Melo**

Professor Associado, Departamento Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Helena Mendes Gil**

Professora Catedrática, Departamento de Engenharia Química, Universidade de Coimbra

**Prof. José António de Oliveira Simões**

Professor Associado com Agregação, Departamento Engenharia Mecânica, Universidade de Aveiro

**Prof. Paulo Jorge da Silva Bártolo**

Professor Coordenador, Departamento de Engenharia Mecânica, Instituto Politécnico de Leiria

.

## **Agradecimentos**

Aos professores José António de Oliveira Simões e Paulo Jorge da Silva Bártolo pela orientação, pelo incansável apoio e dedicação que tiveram para comigo ao longo deste trabalho.

A toda a minha família pelo apoio prestado durante o decorrer deste desafio.

Aos amigos do departamento pelo apoio para concretizar o trabalho proposto, nomeadamente ao Artur Mateus, Henrique Almeida, Carlos Dias, Carlos Capela e Adelino Cerva pelo contributo prestado para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Doutor Nelson Ferreira pelo apoio prestado no desenvolvimento do algoritmo em MATLAB.

Às alunas, do curso de Design Industrial da Escola Superior de Artes e Design, Jessica e Sónia pelo apoio no desenvolvimento do design para a estrutura exterior do equipamento.

Ao Neri Volpato, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, pela disponibilização e pela adaptação do software RP<sup>3</sup> ao equipamento Bioextruder.

Ao Marco Domingos, do laboratório Biolab, da Universidade de Pisa pelos testes biológicos efectuados.

Este trabalho foi possível graças ao apoio de:

Rede Temática Ibero-americana BIOFAB, “Biofabricação: Materiais, Processes e Simulação” financiado pela CYTED -Ciencia Y Tecnologia Para El Desarrollo.

À empresa Roland e à empresa Grafimpor, pela disponibilização do equipamento base utilizado.

Ao colega Luís Oliveira e à empresa Farmi.

## Palavras-chave

Engenharia de tecidos, Biofabricação, *Scaffolds*, processos aditivos, policaprolactona

## Resumo

A engenharia de tecidos é um domínio emergente multidisciplinar, que combina especialistas de múltiplos domínios no sentido de se produzirem substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função de um tecido ou órgão. A estratégia mais importante em engenharia de tecidos envolve a deposição de células sobre matrizes de suporte biocompatíveis e biodegradáveis. Esta estratégia permite a manipulação experimental a três níveis com o objectivo de se obterem estruturas optimizadas: células, os materiais utilizados no fabrico de matrizes de suporte (*scaffolds*) e o processo de fabrico. Neste trabalho propõe-se um novo processo de biofabricação baseado no princípio da extrusão e designado por Bioextruder. Este sistema foi concebido para a produção de matrizes multifuncionais ou para a impressão de soluções célula/polímero. O sistema foi testado para o caso da policaprolactona, material biocompatível e biodegradável. Com este material produziram-se *scaffolds* com diferentes topologias, possuindo poros de geometria quadrada com dimensão aproximada de 650  $\mu\text{m}$  e diâmetro de filamento de 250  $\mu\text{m}$ . As condições de processamento não originaram qualquer tipo de alteração química na estrutura da policaprolactona, preservando as suas características de biocompatibilidade. Foi observado no fabrico dos *scaffolds* um elevado grau de repetibilidade e elevada precisão. Finalmente a análise de citotoxicidade efectuada sobre a policaprolactona processada e não processada demonstrou um elevado nível de proliferação celular.

**Keywords**

Tissue Engineering, Biofabrication, scaffolds, additive processes, polycaprolactone

**Abstract**

Tissue engineering is an emerging, multidisciplinary scientific field where a broad range of experts combine their knowledge and efforts in order to produce biological substitutes to restore, maintain or improve tissue function. The most promising approach in tissue engineering involves the seeding of 3D biocompatible and biodegradable scaffolds, with donor cells to promote tissue regeneration. This approach allows experimental manipulation at three levels to achieve optimal constructs: the cells, the biomaterial used for the scaffold and the fabrication technique. This study proposes a novel extrusion based technology called Bioextruder to produce functionally graded tissue engineering scaffolds and to print solutions cell/polymer. Polycaprolactone (PCL) has been used to test the Bioextruder device. Scaffolds with different geometries have been made by layers of directionally aligned microfilaments. The PCL scaffolds were produced with an approximate channel size of 650  $\mu\text{m}$ , filament diameter of 250  $\mu\text{m}$  and regular geometrical square pores. Processing conditions do not cause any chemical change in the structure of PCL, keeping its biocompatibility characteristics. High levels of accuracy and repeatability have been achieved. Finally cytotoxicity analysis of both non processed and processed PCL revealed a high level of cell proliferation.

# Índice

|   |     |
|---|-----|
| Índice .....  | i   |
| Lista de Figuras .....                                      | iii |
| Lista de Tabelas .....                                      | vi  |
| Capítulo 1 – Introdução .....                               | 1   |
| 1.1 Engenharia de tecidos .....                             | 1   |
| 1.2 <i>Scaffolds</i> .....                                  | 6   |
| 1.3 Objectivos e estrutura da tese .....                    | 8   |
| Capítulo 2 – Processos de fabrico de <i>scaffolds</i> ..... | 11  |
| 2.1 Introdução .....  | 11  |
| 2.2 Captação de dados médicos .....                         | 14  |
| 2.2.1 Tomografia computadorizada.....                       | 14  |
| 2.2.2 Ressonância magnética .....                           | 19  |
| 2.2.3 Ultrasonografia .....                                 | 20  |
| 2.2.4 Norma DICOM.....                                      | 21  |
| 2.3 Ficheiros STL.....                                      | 21  |
| 2.4 Fatiamento do modelo STL.....                           | 25  |
| 2.5 Processos aditivos .....                                | 27  |
| 2.5.1 Sinterização.....                                     | 27  |
| 2.5.2 Estereolitografia .....                               | 30  |
| 2.5.3 <i>Inkjet Printing</i> .....                          | 39  |
| 2.5.4 Extrusão .....  | 48  |
| 2.6 Conclusões .....  | 56  |
| Capítulo 3 – Sistema Bioextruder .....                      | 59  |
| 3.1 Introdução .....  | 59  |
| 3.2 Hardware do sistema Bioextruder .....                   | 61  |
| 3.2.1 Estrutura envolvente .....                            | 61  |
| 3.2.2 Sistemas de extrusão.....                             | 65  |
| 3.2.3 Plataforma .....                                      | 68  |
| 3.2.4 Sistema de Esterilização .....                        | 69  |
| 3.2.5 Software .....  | 70  |
| Capítulo 4 – Resultados Experimentais .....                 | 78  |
| 4.1 Introdução .....  | 78  |
| 4.2 Material e Técnicas de caracterização utilizadas .....  | 78  |
| 4.3 Produção de <i>scaffolds</i> .....                      | 86  |
| 4.4 Citotoxicidade .....                                    | 92  |
| Capítulo 5 - Conclusões e trabalhos futuros .....           | 98  |
| 5.1 Conclusões .....  | 98  |



|     |                        |     |
|-----|------------------------|-----|
| 5.2 | Trabalhos Futuros..... | 100 |
|     | Referências.....       | 102 |

## Lista de Figuras

|   |    |
|---|----|
| Figura 1.1– Investimento mundial em engenharia de tecidos .....   | 3  |
| Figura 1.2 – Proliferação celular sobre <i>scaffolds</i> em bioreactor (Ellis <i>et al</i> , 2005). ....  | 4  |
| Figura 1.3 – Engenharia de tecidos para regeneração de cartilagem e reconstrução de um defeito numa orelha (Rotter <i>et al</i> , 2007). ....   | 5  |
| Figura 1.4 – Deposição de células e proliferação celular sobre <i>scaffolds</i> .....   | 6  |
| Figura 2.1 – Classificação dos processos aditivos de biofabricação.....   | 11 |
| Figura 2.2 - Etapas precedentes ao processo de biofabricação.....   | 12 |
| Figura 2.3 - Simplificação de estruturas biológicas por estruturas Biofabricadas equivalentes mais simples (Sun <i>et al</i> , 2005). ....  | 13 |
| Figura 2.4 – Sistema convencional de tomografia computadorizada.....  | 16 |
| Figura 2.5 – Imagens tridimensionais obtida por ultrasonografia.....  | 20 |
| Figura 2.6 – Formato STL em ASCII.....  | 22 |
| Figura 2.7 - Formato STL em binário .....   | 23 |
| Figura 2.8 – a) Violação da regra da adjacência – triangulação incorrecta. b) Triangulação correcta.....  | 24 |
| Figura 2.9 – Esquema do processo Sinterização .....   | 27 |
| <b>Figura 2.10</b> - <i>Scaffold</i> obtido em PCL por SLS. a) Modelo CAD. b) <i>Scaffold</i> físico (Williams <i>et al</i> , 2005).....  | 29 |
| Figura 2.11 – Processo de estereolitografia. ....   | 31 |
| Figura 2.12 – Sistema de microestereolitografia integrante em desenvolvimento no Instituto Politécnico de Leiria. ....  | 34 |
| Figura 2.13 - Cultura celular num <i>scaffold</i> obtido por microestereolitografia em polipropileno-fumarato (a) imagem obtida por microscopia electrónica de varrimento ( <i>Scanning Electronic Microscopy</i> - SEM) após 4 dias da deposição das células. (b) imagem SEM após 1 semana da deposição das células. (c) imagem SEM após 4 semana da deposição das células (Jin <i>et al</i> , 2007). .... | 36 |
| Figura 2.14 – <i>Scaffold</i> obtidos por microestereolitografia (Stampfl <i>et al</i> , 2007) .....  | 37 |
| Figura 2.15 – Processo de fabricação de <i>scaffolds</i> para engenharia de tecidos envolvendo mecanismos de irradiação directa de soluções polímero/célula (Bhatia <i>et al</i> , 2005) .....  | 38 |
| Figura 2.16 – Processo de impressão 3D .....  | 40 |
| Figura 2.17 – a) Estratégia de deposição “drop-on-demand”, b) estratégia de deposição por jacto contínuo.....   | 41 |
| Figura 2.18 – Método de membrana para a formação de partículas (Venuvinod e Weiyin, 2004). ....   | 42 |
| <b>Figura 2.19</b> – Substitutos ósseos Theriform.....  | 43 |
| <b>Figura 2.20</b> – Processo de Bioimpressão .....   | 45 |
| Figura 2.21 – Processo de bioimpressão desenvolvido pelo grupo liderado por Boland  |    |

|   |    |
|---|----|
| (Varghese <i>et al</i> , 2005).....   | 46 |
| <b>Figura 2.22</b> - Células endoteliais em matriz de alginato produzidas por bioimpressão (Boland <i>et al</i> , 2006).....  | 46 |
| <b>Figura 2.23</b> – A) Bioimpressão células procarióticas, B) e C) - bioimpressão de células neuronais (Xu <i>et al</i> , 2004, 2005 ) .....                                     | 47 |
| <b>Figura 2.24</b> – Processo FDM proposto por Crump (Crump, 1990) .....  | 48 |
| Figura 2.25 - Princípio de funcionamento de um sistema de extrusão para produção de <i>scaffolds</i> .....  | 49 |
| Figura 2.26 – Sistema de deposição de fibras desenvolvido por Woodfield <i>et al</i> . (2004) .....   | 50 |
| <b>Figura 2.27</b> – <i>Scaffolds</i> produzidos por 3D Fiber Deposition (Woodfield <i>et al</i> , 2004).....   | 51 |
| <b>Figura 2.28</b> - Sistema Precision Extruding Deposition.....  | 52 |
| <b>Figura 2.29</b> - <i>Scaffolds</i> obtidos pelo sistema M-LDM (Li e Zhuo, 2008) .....  | 53 |
| <b>Figura 2.30</b> - Sistema designado por Multi-Nozzle Deposition desenvolvido por Khalil .....  | 54 |
| <b>Figura 2.31</b> – Sistema de Robotic Dispensing (Hutmacher <i>et al</i> , 2007) .....  | 55 |
| <b>Figura 3.1</b> – Componentes considerados para o sistema de Bioextrusão .....  | 59 |
| Figura 3.2 – Equipamento base da Roland utilizado .....   | 60 |
| <b>Figura 3.3</b> – Diferentes conceitos para a estrutura envolvente do sistema Bioextruder a), b), c) Propostas apresentadas, d) design da estrutura exterior seleccionado. .... | 62 |
| Figura 3.4 – Molde em poliestireno extrudido produzido em camadas para obtenção da estrutura envolvente do sistema Bioextruder .....  | 63 |
| <b>Figura 3.5</b> – Estrutura obtida em compósito. ....   | 64 |
| Figura 3.6 – Estrutura envolvente em compósito após aplicação no equipamento .....  | 65 |
| <b>Figura 3.7</b> – Sistema de extrusão contendo um reservatório .....  | 67 |
| Figura 3.8 – a) Modelo CAD do sistema multi-material e b) modelo físico do sistema multi-material.....  | 68 |
| <b>Figura 3.9</b> – Plataforma de construção do equipamento Bioextruder.....  | 69 |
| <b>Figura 3.10</b> – Sistema de esterilização .....   | 70 |
| <b>Figura 3.11</b> – Software RP <sup>3</sup> adaptado para o sistema Bioextruder .....   | 71 |
| <b>Figura 3.12</b> – Interface do algoritmo criado em Matlab.....   | 72 |
| <b>Figura 3.13</b> - Fluxograma para readstl.m. ....  | 72 |
| <b>Figura 3.14</b> - Fluxograma para slicestl.m. ....   | 73 |
| <b>Figura 3.15</b> - Fluxograma da função fazciclos. ....   | 74 |
| <b>Figura 3.16</b> - Exemplo de selecção dos segmentos de contorno para um plano .....  | 76 |
| <b>Figura 3.17</b> – Pré-visualização das trajectórias calculadas .....   | 77 |
| <b>Figura 3.18</b> – Exemplo do ficheiro de saída para o equipamento Bioextruder .....  | 77 |
| <b>Figura 4.1</b> – Estrutura química da policaprolactona.....  | 78 |
| Figura 4.2 – Calorimetria diferencial de varrimento de polycaprolactone 6500.....   | 80 |
| Figura 4.3 - Espectro de ressonância magnética nuclear para o material não processado.....  | 82 |
| Figura 4.4 - Espectro de ressonância para o material processado .....   | 83 |

|  |    |
|--|----|
| Figura 4.5 – a) Cromatograma , b) Curva de distribuição para o material processado.....  | 84 |
| Figura 4.6 – a) Cromatograma , b) Curva de distribuição para o material não processado.....  | 85 |
| <b>Figura 4.7</b> – Imagem <i>scaffold</i> produzido com 50x50x20 mm. ....   | 87 |
| <b>Figura 4.8</b> – Imagem <i>scaffold</i> produzidos com 50x50x8 mm.....  | 87 |
| <b>Figura 4.9</b> – Imagem <i>scaffold</i> redondo diâmetro 25 com altura de 10 mm. ....   | 88 |
| <b>Figura 4.10</b> – Imagem <i>scaffold</i> quadrado 30x30, furo quadrado 10x10 e altura 5 mm .....  | 88 |
| <b>Figura 4.11</b> – Micrografia de uma estrutura porosa em PCL .....  | 89 |
| <b>Figura 4.12</b> – Zona de menor regularidade na ligação entre filamentos.....   | 90 |
| <b>Figura 4.13</b> – Micrografia do scaffold que evidencia uma continuidade de ligação entre filamentos .....                                  | 90 |
| <b>Figura 4.14</b> - Filamento de scaffolds com poros de pequena dimensão distribuídos de forma irregular .....                                | 91 |
| <b>Figura 4.15</b> - Redução do composto tetrazólico (WST-1) a formazan.....   | 92 |
| <b>Figura 4.16</b> - Extracto não diluído com a inclusão de fibroblatos 3T3 Clone A31. ....  | 93 |
| <b>Figura 4.17</b> - Extracto diluído numa proporção 1:1 em terreno de cultura completo DMEM com a inclusão de fibroblatos 3T3 Clone A31. .... | 94 |
| <b>Figura 4.18</b> - Extracto diluído numa proporção 1:4 em terreno de cultura completo DMEM com a inclusão de fibroblatos 3T3 Clone A31. .... | 94 |
| <b>Figura 4.19</b> – Proliferação de células em material após processamento por Bioextrusão.....   | 96 |
| <b>Figura 4.20</b> – Proliferação de células em material antes do processamento .....  | 97 |
| <b>Figura 5.1</b> – Medicina regenerativa como domínio de investigação multidisciplinar .....  | 99 |

## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1.1 – Lista de pacientes a aguardarem por um transplante de órgão ( <i>United Network for Organ Sharing</i> (UNOS), 2008) .....                | 1  |
| Tabela 2.1 – Escala de <i>Hounsfield</i> – coeficientes de atenuação do ar, tecidos e fluidos (Enderle <i>et al</i> , 2005; Pisco e Sousa 1999) ..... | 17 |
| Tabela 2.2 – Vantagens e desvantagens do processo SLS .....   | 30 |
| Tabela 2.3 – Vantagens e desvantagens da estereolitografia .....  | 39 |
| Tabela 2.4 – Vantagens e desvantagens do processo Inkjet Printing .....   | 47 |
| Tabela 2.5 - Vantagens e desvantagens do processo FDM .....   | 56 |
| Tabela 2.6 - Vantagens e desvantagens dos processos aditivos .....  | 58 |
| Tabela 3.1 - Especificações do equipamento base (Roland CAMM PNC-2300) .....  | 61 |
| Tabela 3.2 – Componentes principais do sistema de controlo de temperatura .....   | 68 |
| Tabela 4.1 - Principais características da policaprolactona utilizada .....   | 79 |
| Tabela 4.2– Valores de massa molar ( $M_n$ ) número, peso e médias ( $M_n$ , $M_w$ , $M_z$ ) obtidos por GPC .....                                    | 86 |
| Tabela 4.3 – Condições de processamento para o material CAPA 6500 .....   | 86 |

## Capítulo 1 – Introdução

### 1.1 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é um domínio científico recente, que tem como objectivo a recuperação e regeneração de tecidos e órgãos (Atala, 2007). Este domínio emergiu como consequência do problema da escassez de órgãos para transplantação. O mau funcionamento ou a perda de funções totais ou parciais de um órgão ou tecido, resultante de doenças ou ferimentos é actualmente um dos mais importantes e preocupantes problemas de saúde pública atingindo um número muito significativo de pessoas em todo o mundo (Bártolo *et al*, 2007). Só nos EUA, o número de pacientes a aguardar por um transplante ascende a mais de 100.000 tal como se indica na Tabela 1.1

**Tabela 1.1** – Lista de pacientes a aguardarem por um transplante de órgão (*United Network for Organ Sharing* (UNOS), 2008)

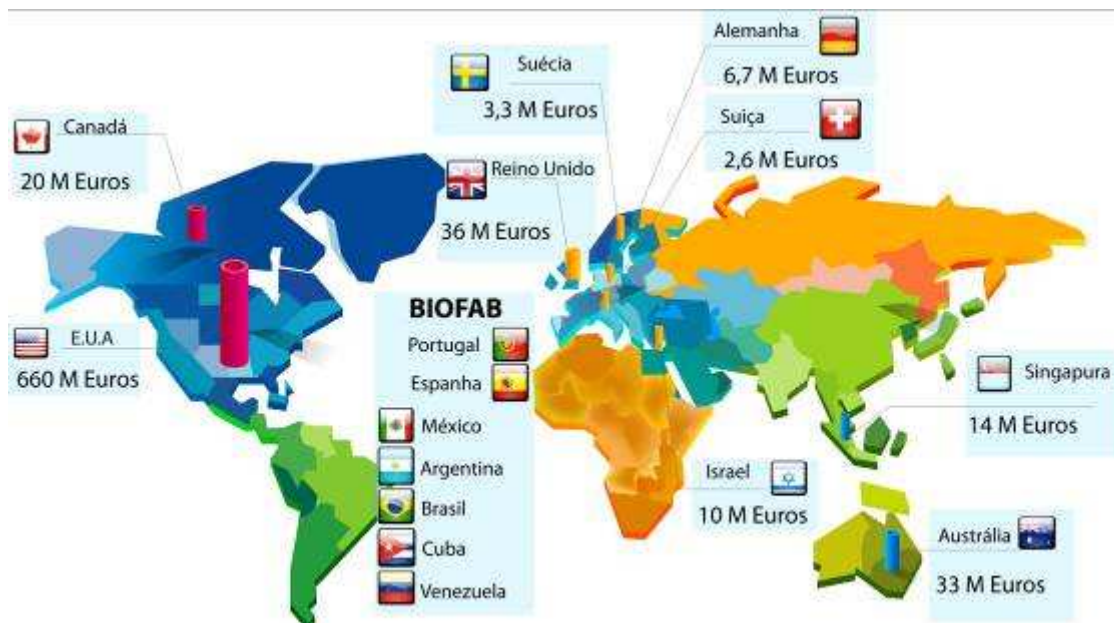
| Tipo de transplante | Pacientes a aguardarem por transplante |
|---------------------|--|
| Rim                 | 76,083                                 |
| Fígado              | 16,283                                 |
| Pâncreas            | 1,614                                  |
| Coração             | 2,593                                  |
| Intestino           | 230                                    |
| Todos os órgãos     | 98,900                                 |

O termo engenharia de tecidos foi definido pela primeira vez por *Skalak e Fox* (1988) como sendo “a aplicação de princípios e métodos de engenharia e das ciências da vida para a compreensão das relações estrutura/função dos tecidos e para o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos” (Daar e Greenwood, 2007). Posteriormente, *Langer e Vacanti* (1993), considerados os grandes impulsionadores deste domínio científico definiram engenharia de tecidos como “um campo interdisciplinar que aplica os princípios de engenharia e das ciências da vida no desenvolvimento de

substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido”. O primeiro relatório técnico detalhado sobre engenharia de tecidos foi apresentado em 2003 pela Fundação Norte-Americana para a Ciência e Tecnologia. Três importantes momentos históricos no domínio da engenharia de tecidos devem ser igualmente mencionados. O primeiro diz respeito à constituição da rede *ExpertTissues (Network of excellence on novel therapeutic strategies for tissue engineering of bone and cartilage using second generation of biomimetic scaffolds)*. Esta rede de excelência iniciada em 2004 conta com investigadores de vinte parceiros e treze países, sendo três desses parceiros industriais (*Cell Med, Materialise NV, e Kedrion*). Em 2005, teve lugar em Pequim a primeira *workshop* sobre biofabricação em que participaram alguns dos principais grupos americanos, europeus e asiáticos de engenharia de tecidos. Neste encontro, foi definido pela primeira vez biofabricação como sendo “a utilização de técnicas aditivas usando biomateriais e incorporando células e factores de crescimento destinadas a produção de *scaffolds* ou a produção directa de órgão e tecidos” (Bártolo, 2008). Finalmente, teve início em Janeiro de 2008 a rede temática “Rede Ibero Americana de biofabricação: materiais, processos e simulação (BIOFAB)”, dedicada ao desenvolvimento de uma metodologia integrada para a biofabricação de estruturas bioactivas destinadas a promover e melhorar o desempenho de órgãos ou tecidos a partir de conhecimentos na área da engenharia, ciências da vida e ciências básicas. Esta rede integra mais de duzentos investigadores de centros de investigação e universidades de Portugal, Espanha, Brasil, Cuba, México, Venezuela e Argentina. Na Figura 1.1 apresenta-se o investimento mundial em engenharia de tecidos.

Quatro estratégias têm sido adoptadas para o tratamento de problemas associados a órgão ou tecidos danificados (Ikada, 2006; Bell, 2000):

- i) Administração de medicamentos (ex. injeções de insulina);
- ii) Utilização de tecido retirado de uma zona do corpo não danificada do paciente para o tratamento de zonas danificadas, autoenxerto (transplante de pele de uma região queimada para uma região não queimada);



**Figura 1.1**– Investimento mundial em engenharia de tecidos

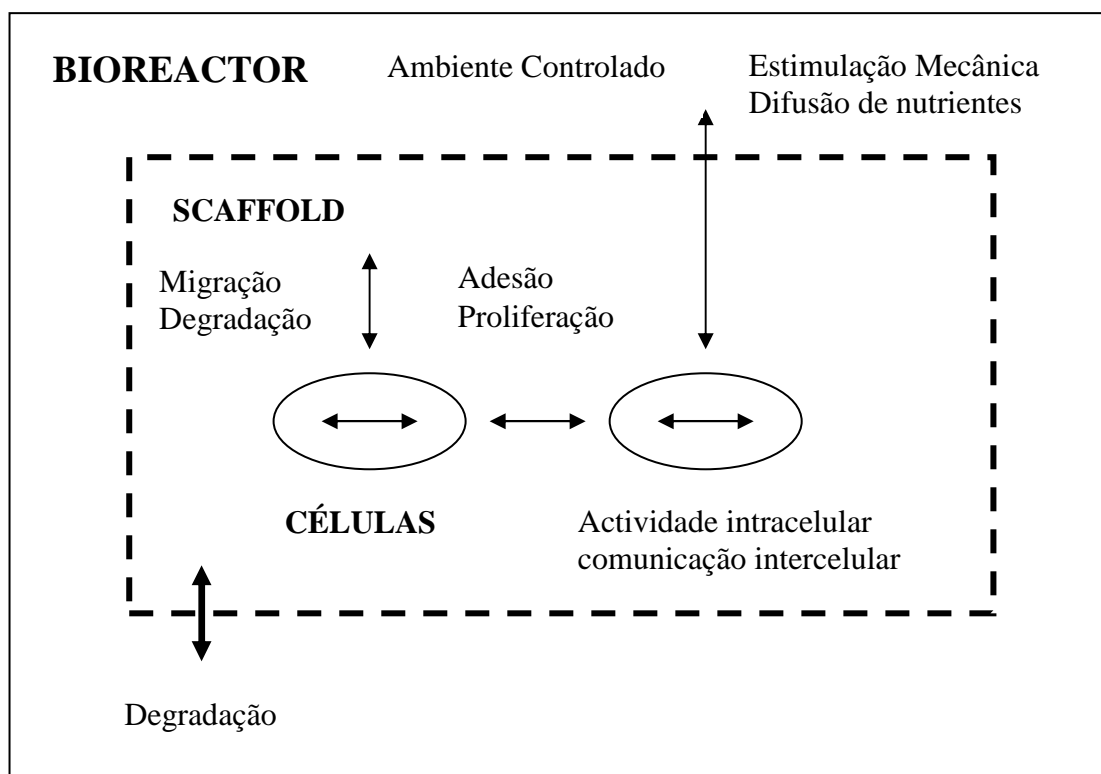
- iii) Utilização de tecidos ou órgãos doados (aloenxerto). Esta estratégia coloca vários desafios, pois tal como foi anteriormente mencionado a procura de órgãos é bastante superior ao número de órgãos doados e tem que se ter em conta a existência de riscos de rejeição. Os receptores de aloenxertos devem utilizar medicamentos que minimizem o risco de rejeição mas que podem no entanto, provocar efeitos secundários.
- iv) Construção de matrizes porosas e biodegradáveis (*scaffolds*) destinadas à adesão, diferenciação e proliferação de células.

As estratégias envolvendo a fabricação de *scaffolds* e a sua utilização são as mais usadas em engenharia de tecidos. Neste caso duas estratégias podem ser utilizadas (Bártolo *et al*, 2007; Ikada, 2006; Freed e Novakovic, 2000):

- **Regeneração *in vitro***: produção *in vitro* de um tecido por deposição de células num *scaffold* de um biomaterial adequado, implantando em seguida este tecido no corpo. Neste caso, o crescimento celular ocorre em bioreactor tal como se indica na Figura 1.2.



- **Regeneração *in vivo***: implantação de um *scaffold* de um biomaterial adequado, contendo ou não células, no corpo do paciente de modo a facilitar a regeneração *in vivo* do tecido.



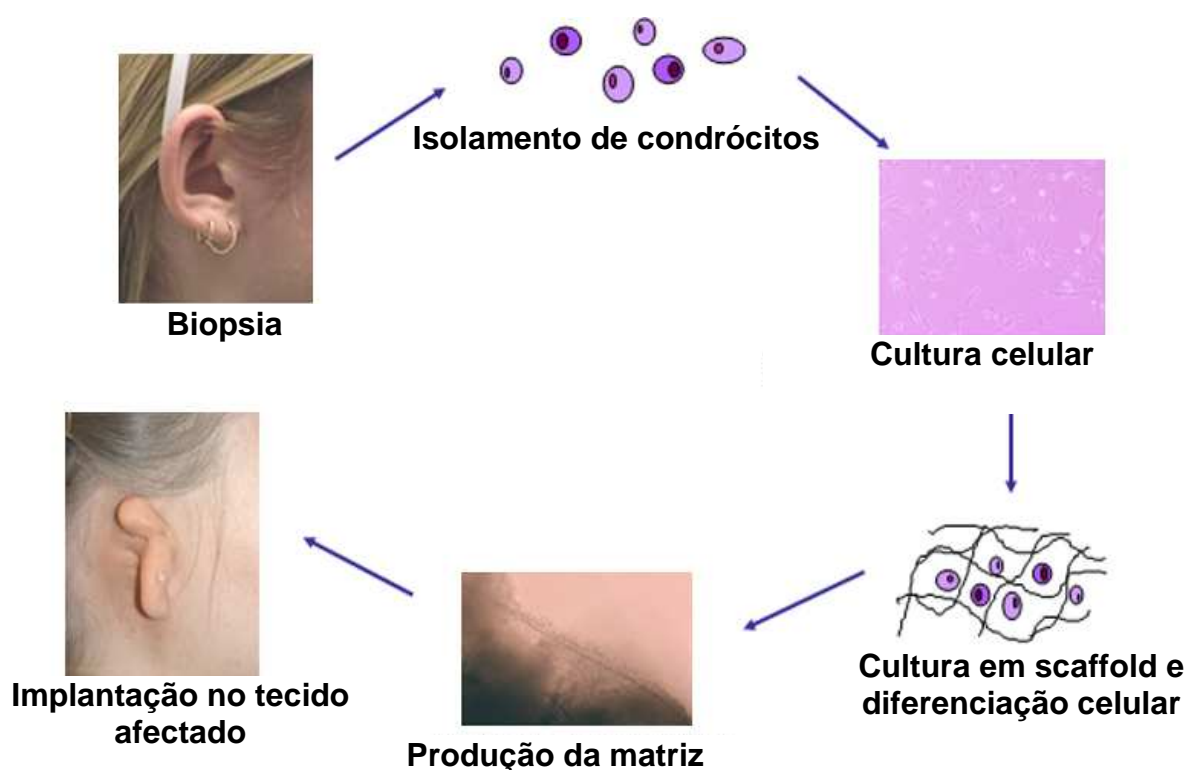
**Figura 1.2** – Proliferação celular sobre *scaffolds* em bioreactor (Ellis *et al*, 2005).

A primeira abordagem é a mais utilizada em engenharia de tecidos (Bártolo *et al*, 2007; Hutmacher *et al*, 2004). Neste caso, células do próprio paciente são retiradas por biopsia, multiplicadas *in vitro*, colocadas numa matriz de suporte porosa e biodegradável (*scaffold*), onde com o auxílio de factores de crescimento se vão diferenciar e proliferar. Durante o processo de formação de novo tecido o *scaffold* deverá degradar-se com uma taxa próxima da taxa de regeneração do tecido (Ikada, 2006).

Para além do impacto social, a engenharia de tecidos tem igualmente suscitado grande interesse comercial. Desde que o termo engenharia de tecidos foi utilizado pela primeira vez, grandes progressos têm sido alcançados, tendo sido lançada a primeira geração de produtos comerciais (por exemplo pele

artificial e cartilagem). Entre 1990 e 2002, o total de capital investido à escala mundial em indústrias relacionadas com a engenharia de tecidos rodava os três biliões de euros, com mais de 90% deste investimento proveniente do sector privado. Existe igualmente um interesse comercial crescente em aplicações de engenharia de tecidos que extravasam a simples terapêutica médica. Dois exemplos importantes de mercados emergentes para a engenharia de tecidos são (NSF Report, 2007):

- Teragnóstico: combinação de acções de diagnóstico e tratamento. Espera-se que este domínio represente em 2009 perto de 2,6 biliões de euros.
- Desenvolvimento de modelos tecidulares humanos.

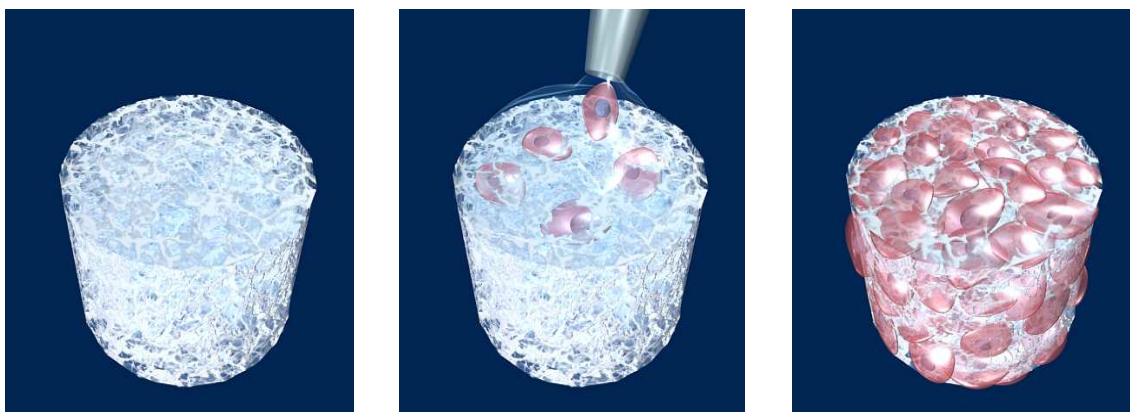


**Figura 1.3** – Engenharia de tecidos para regeneração de cartilagem e reconstrução de um defeito numa orelha (Rotter *et al*, 2007).

Estes modelos podem em parte substituir os cada vez mais caros e impopulares estudos em cobaias animais assim como, na redução dos custos associados ao desenvolvimento e lançamento de novos medicamentos no mercado, hoje estimados em cerca de 550 milhões de euros (NSF *Report*, 2007).

## 1.2 *Scaffolds*

Os *scaffolds* servem como suporte estrutural para acomodar e estimular o crescimento de forma organizada de um novo tecido (Figura 1.4).



**Figura 1.4** – Deposição de células e proliferação celular sobre *scaffolds*

Em engenharia de tecidos, os *scaffolds* cumprem um papel fundamental, tanto *in vivo* como *in vitro*, ao desempenharem várias funções importantes (Bártolo *et al*, 2007):

- Permitem a adesão, proliferação e diferenciação de células;
- Podem conter factores de crescimento;
- Permitem a difusão de nutrientes e oxigénio.

São responsáveis pela criação de um ambiente mecânico e biológico adequado à regeneração de tecidos de forma organizada.

Para tal, os *scaffolds* devem satisfazer um conjunto de requisitos biológicos e mecânicos (Bártolo *et al*, 2007):

**a) Requisitos biológicos**

- Biocompatibilidade – os *scaffolds* devem ser produzidos com materiais não tóxicos e os seus produtos de degradação não devem induzir reacções alérgicas;
- Biodegradabilidade – os *scaffolds* devem degradar-se originando produtos não tóxicos. O principal mecanismo de degradação é por hidrólise. Outros mecanismos de degradação são: a acção enzimática e os esforços mecânicos;
- Taxa de degradação controlada – os *scaffolds* devem possuir uma taxa de degradação controlável e ajustável à taxa de regeneração dos tecidos, assim como apropriada porosidade, topologia de poros, distribuição de poros e elevada interconectividade entre poros permitindo a adesão celular e facilitando a vascularização. Os valores típicos de porosidade rondam os 90 % com poros a variar entre 20 e 220  $\mu\text{m}$ . No crescimento de fibroblastos, tem sido reportadas dimensões de 20  $\mu\text{m}$ , no caso da regeneração de pele valores entre 20 e 125  $\mu\text{m}$  e para a regeneração óssea poros com dimensões entre 100 e 250  $\mu\text{m}$ ;
- Capacidade para o transporte de sinalizadores biomoleculares.

**b) Requisitos mecânicos:**

- Adequadas propriedades mecânicas;
- Adequado “acabamento” superficial de maneira a facilitar-se o processo de adesão celular;
- Facilmente esterilizáveis por aquecimento a altas temperaturas, exposição a radiação ou imersão num agente esterilizador não sofrendo qualquer alteração mecânica decorrente deste processo.

Várias são as técnicas desenvolvidas para a produção destas estruturas. As técnicas designadas por convencionais (lexiviação, membranas laminadas, processamento a alta pressão, “electrospinning”, etc.) envolvem diferentes processos de obtenção de estruturas de elevada porosidade tendo sido as primeiras a serem utilizadas em engenharia de tecidos (Morsi et al, 2007; Ikada, 2006). Embora simples, estas técnicas não permitem, no entanto, um controlo preciso sobre as dimensões, geometria, distribuição dos poros e não garantem a sua interconectividade não sendo por isso, as mais indicadas para a obtenção de scaffolds 3D (Morsi et al, 2007). Por outro lado, são técnicas laboriosas envolvendo em regra a utilização de solventes, muitas vezes orgânicos que podem ser tóxicos para as células, sendo preferencialmente utilizadas para a produção de scaffolds em material polimérico (Ikada, 2006).

As técnicas aditivas largamente utilizadas em termos industriais quer no fabrico de protótipos (*rapid prototyping*) no fabrico rápido de ferramentas (*rapid tooling*), ou para a fabricação directa de produtos sem recurso a qualquer ferramenta de produção (*rapid manufacturing*), têm vindo a ser encaradas como alternativas bastante fiáveis para o fabrico de scaffolds em engenharia de tecidos (Bártolo e Gaspar, 2008; Bártolo et al, 2007). Estas técnicas permitem a obtenção directa de scaffolds com geometria controlada, uniformidade de distribuição de poros, interconectividade entre poros não necessitando de grande intervenção humana nem utilizando solventes orgânicos (Bártolo et al, 2007; Tsang et al, 2006; Leong et al, 2003). Dependendo da estratégia utilizada (ver capítulo 2) é possível obterem-se scaffolds poliméricos, scaffolds cerâmicos ou scaffolds em compósito polímero cerâmico. É neste domínio que esta tese se insere ao pretender desenvolver um novo conceito de fabricação aditiva de scaffolds multi-material com ou sem encapsulamento de células.

### **1.3 Objectivos e estrutura da tese**

O objectivo central deste trabalho de investigação consiste no desenvolvimento de um novo conceito de biofabricação, utilizando o princípio da extrusão aditiva (ver capítulo 2) para a produção de scaffolds multi-material,

condicionando assim o processo de crescimento, diferenciação e proliferação de células, utilizando ou não células. Para tal, o sistema deverá possuir vários reservatórios de materiais, uns aquecidos (para o processamento de biocerâmicos ou de biopolímeros sintéticos de elevada temperatura de fusão) e outros a temperatura ambiente (para a impressão de materiais de baixa viscosidade podendo encapsular células). O trabalho de investigação desenvolvido, tal como se reportará ao longo deste documento incidiu sobre três domínios fundamentais:

1. Concepção do sistema de bioextrusão, selecção de componentes, fabrico e montagem;
2. Desenvolvimento de *software* para a definição dos *scaffolds* a produzir e respectivas estratégias de deposição;
3. Caracterização dos primeiros biomateriais a serem utilizados como teste e produção de *scaffolds* para validação do conceito.

A tese encontra-se assim dividida em cinco capítulos que descrevem de forma detalhada o trabalho desenvolvido. O primeiro capítulo introduz o tema da dissertação e apresenta os principais objectivos deste trabalho.

## **Capítulo 2 – técnicas aditivas de biofabricação**

Neste capítulo, descrevem-se as principais técnicas aditivas de biofabricação apresentando-se as principais vantagens e limitações de cada uma assim como os materiais mais utilizados. Apresenta-se igualmente o fluxo de informação necessária para a produção de *scaffolds* e destacam-se os principais sistemas de captação de imagens médicas que constituem um importante suporte à utilização das técnicas de biofabricação em engenharia de tecidos.

## **Capítulo 3 – Sistema BioExtruder**

Este capítulo, reporta o trabalho de desenvolvimento em termos de *hardware* e *software* destinado a obtenção de um sistema multi-material de bioextrusão. As opções tomadas durante a fase de concepção e fabrico são igualmente justificadas.

#### **Capítulo 4 – Resultados experimentais**

Neste capítulo, apresentam-se diferentes configurações de estruturas porosas produzidas com o sistema BioExtruder. O material utilizado, a policaprolactona é um biopolímero sintético cujas características e respectiva caracterização é aqui apresentada. Descrevem-se igualmente as técnicas de caracterização utilizadas e analisa-se o desempenho biológico das estruturas obtidas através de análises de citotoxicidade.

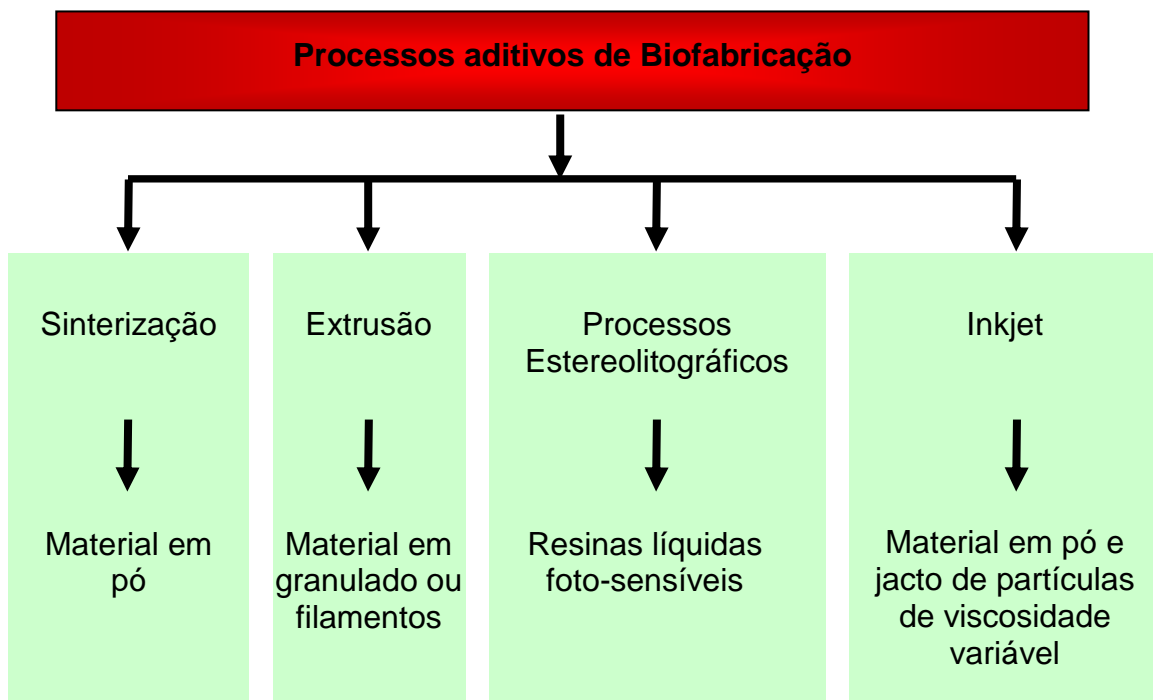
#### **Capítulo 5 – Conclusões e trabalho futuro**

Os principais resultados obtidos com este trabalho de investigação são sumariados e discutidos neste capítulo, onde se apresentam igualmente oportunidades abertas por este estudo e merecedoras de trabalhos de investigação a realizar no futuro.

## Capítulo 2 – Processos de fabrico de *scaffolds*

### 2.1 Introdução

Biofabricação foi definida em 2005 como sendo a utilização de células, biomateriais e técnicas de fabrico aditivas para a produção directa a partir de dados CAD de estruturas de suporte destinadas a regeneração ou reparação de tecidos e órgãos (Bártolo, 2008). Estas técnicas aditivas, objecto de análise neste capítulo, utilizam diferentes princípios de fabrico e materiais tal como se indica na Figura 2.1 (Tsang *et al*, 2006; Hutmacher *et al*, 2004; Yeong *et al*, 2004; Leong *et al*, 2003). No entanto, independentemente do princípio utilizado, a sequência de etapas que caracteriza todas estas técnicas é a mesma e envolve a captação de dados médicos, a produção de modelos em CAD, a conversão destes modelos em formato STL de modo a puderem ser processados pelos diferentes sistemas aditivos existentes, o fatiamento do modelo STL em secções transversais correspondentes às diversas camadas a produzir e finalmente a obtenção do modelo físico final (Figura 2.2).



**Figura 2.1** – Classificação dos processos aditivos de biofabricação



### Captura de dados

- Tomografia
- Ressonância Magnética
- Ultrasonografia
- Outros

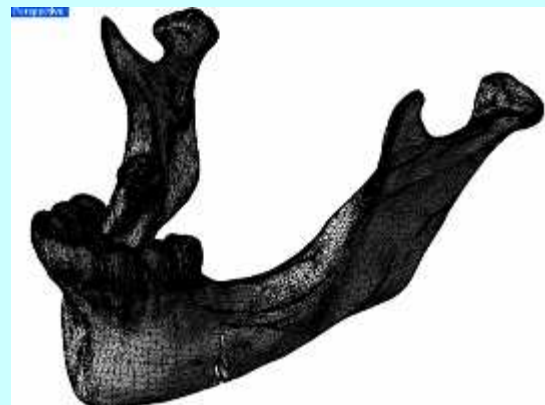


### Tratamento por software (Geração do modelo 3D)

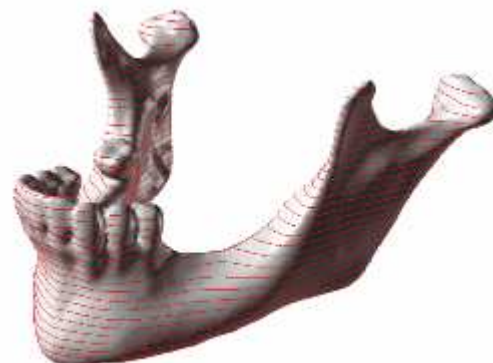
- *MIMICS*
- *Velocity2 Plus*
- *InVesalius*
- Outros



### Geração do modelo STL

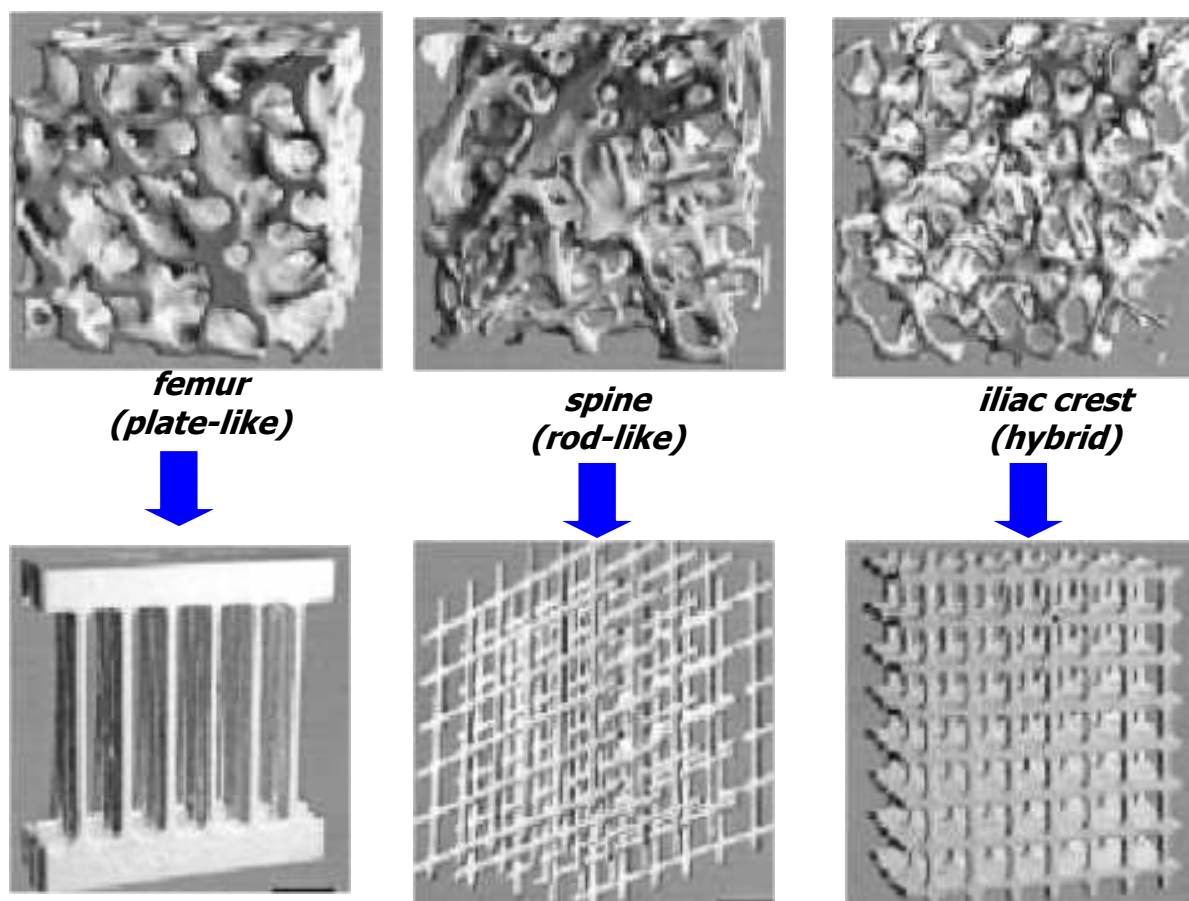


### Fatiamento (operação de *slice*)



**Figura 2.2** - Etapas precedentes ao processo de biofabricação

Habitualmente em biofabricação para engenharia de tecidos a aproximação mais comum consiste na substituição de estruturas biológicas por arquitecturas de geometria regular com características mecânicas e biológicas semelhantes (Figura 2.3) (Almeida, 2006).



**Figura 2.3** - Simplificação de estruturas biológicas por estruturas Biofabricadas equivalentes mais simples (Sun *et al*, 2005).

Neste capítulo, descreve-se de forma detalhada as diferentes etapas associadas a biofabricação de matrizes de suporte. Particular destaque é dado aos processos de fabricação aditivos apresentando-se neste caso as principais vantagens e desvantagens de cada uma das técnicas existentes.

## **2.2 Captação de dados médicos**

Desde a descoberta dos Raios-X por Röntgen em 1895, a imagiologia médica sofreu uma evolução excepcional, passando a desempenhar um papel muito importante na medicina (Dambacher *et al*, 2007).

As principais técnicas utilizadas para a obtenção de dados médicos são a tomografia computadorizada (TAC), a ressonância magnética (RM) e a ultrasonografia (Endo, 2005; Sakas, 2002). Actualmente, é possível obter com alguma facilidade imagens 3D recorrendo aos dados obtidos pelas técnicas referidas. Para tal, é necessário recorrer à utilização de novos softwares desenvolvidos (Dambacher *et al*, 2007). Como os dados obtidos nestas técnicas são diferentes, existiu a necessidade de uniformizar toda a informação obtida, sendo apenas possível com o estabelecimento de um protocolo (DICOM) que dita algumas regras para estes sistemas.

### **2.2.1 Tomografia computadorizada**

Após a descoberta dos Raios-X por Röntgen em 1895 e até aos anos 1970, grande parte da informação médica era obtida por radiologia através de imagens radiográficas convencionais, bidimensionais, com densidades determinadas pela projecção e detecção de Raios-X sobre o paciente (Endo, 2005; Sakas, 2002). Estas imagens, ainda hoje amplamente utilizadas baseiam-se na atenuação que os diferentes tecidos oferecem a passagem dos Raios-X (Dambacher *et al*, 2007). Esta atenuação é traduzida numa película radiográfica por diversos tons numa escala de cinzentos permitindo definir contornos anatómicos (Chao, 2007). Nas imagens, a percepção do detalhe depende, entre outros factores da presença de contraste sendo o limite entre dois órgãos/tecidos tanto mais difícil de perceber quanto menos for a diferença de intensidades.

No ano de 1970, Hounsfield descreveu o processo designado por tomografia computadorizada (TAC) a partir do conceito de radiologia. Esta tecnologia, requer a exposição por parte do paciente a pequenas quantidades de Raios-X, sendo a

absorção da radiação detectada e representada através de um conjunto de imagens 2D. O contraste da imagem representa, tal como nas radiografias, a diferenças na atenuação dos Raios-X (Endo, 2005; Sakas, 2002). Deste modo, cada imagem é definida através de uma matriz de *pixels* correspondentes a diferentes tons de cinzento de acordo com os diferentes valores de atenuação registados. A junção das sucessivas imagens 2D permite a criação em computador de representações tridimensionais do objecto em estudo através da definição, a partir de cada unidade *pixel* de um elemento de volume designado por *voxel*. Vários são os softwares, que tem vindo a ser desenvolvidos no sentido de permitirem a obtenção de modelos 3D a partir de dados de tomografia, nomeadamente, *Velocity2 Plus* (Javelin, USA), *BioBuild* (Anatomics, Austrália), *MIMICS* (Materialise, Bélgica) e *InVesalius* (CenPRA, Brasil) (Bártolo *et al*, 2004). O processamento dos dados tomográficos através deste sistemas, envolve em regra operações de:

- Segmentação – identificação de estruturas de interesse para a reconstrução 2D através da segmentação de imagens;
- Binarização – as imagens em tons de cinza são convertidas em imagens binárias;
- Detecção e afinamento de fronteiras;
- Selecção de pontos de interesse.

Em tomografia, o paciente é colocado numa mesa que se desloca para o interior de um orifício em torno do qual se encontra a ampola de Raios-X num suporte denominado *Gantry* (Enderle *et al*, 2005). Do lado oposto à ampola, encontra-se o detector responsável pela captação da radiação e transmissão da informação resultante ao computador. Nos sistemas convencionais (Figura 2.4), O *Gantry* faz uma rotação de 360° em torno do paciente. Os dados obtidos pelos detectores são processados pelo computador que analisa as variações de absorção de radiação ao longo da secção observada e reconstrói estes dados sob

a forma de uma imagem. A mesa é deslocada e o processo repete-se novamente originando-se uma nova imagem.



**Figura 2.4** – Sistema convencional de tomografia computadorizada

Actualmente, existem outro tipo de máquinas designadas por helicoidais que descrevem uma hélice em torno do paciente em vez de um círculo (Azhari *et al*, 2003). Este sistemas permitem obter informação de uma forma contínua utilizando menores doses de radiação e são em geral mais rápidas que as máquinas convencionais. Nas imagens obtidas por tomografia a dimensão de cada *pixel* é igual a razão entre a região do corte seleccionada pelo operador para recolha de dados e a dimensão da matriz da imagem fotográfica. As imagens obtidas apresentam de forma genérica 12 *bytes* por *pixel*. A determinação da densidade das estruturas observadas é determinada a partir dos coeficientes de atenuação medidos em unidades *Hounsfield* (Tabela 2.1). Se os coeficientes de atenuação da água, do ar e da substância em estudo for  $\beta_{\text{água}}$ ,  $\beta_{\text{ar}}$  e  $\beta_{\text{subs}}$  respectivamente, temos que a unidade *Hounsfield* da substância é dada por (Enderle *et al*, 2005):

$$H = \frac{1000 \times (\beta_{subs} - \beta_{água})}{(\beta_{água} - \beta_{ar})}$$

Sendo assim, a mudança de uma unidade *Hounsfield* corresponde a um coeficiente de atenuação de 0.1 % em relação a diferença entre os coeficiente da água e do ar. De notar que, as imagens obtidas necessitam normalmente de melhoramento de contraste pois os tecidos do corpo humano possuem coeficiente de atenuação bastante próximos (Enderle *et al*, 2005). É também necessário corrigir ruídos, isto é, interferências na imagem que a distorcem, desfocam ou alteram as tonalidades de cinzento.

**Tabela 2.1** – Escala de *Hounsfield* – coeficientes de atenuação do ar, tecidos e fluidos (Enderle *et al*, 2005; Pisco e Sousa 1999)

| Elemento       | Escala de Hounsfield |
|----------------|----------------------|
| Ar             | -1000                |
| Água           | 0                    |
| Osso compacto  | > 250                |
| Osso esponjoso | 130 a 110            |
| Tiróide        | 70 ± 10              |
| Fígado         | 65 ± 5               |
| Baço           | 45 ± 5               |
| Pâncreas       | 40 ± 10              |
| Rim            | 30 ± 10              |
| Sangue         | 55 ± 5               |

Actualmente existem dois tipos de tomografia computadorizada:

- Tomografia computadorizada por transmissão;
- Tomografia computadorizada por emissão.

Na tomografia por transmissão, tal como se disse anteriormente, a imagem é obtida promovendo a passagem de radiação através do corpo que é captada por detectores alinhados com o emissor. O conjunto emissores/detectores faz a

rotação no mesmo plano e os raios são emitidos e recolhidos para vários ângulos. Como resultado, é obtida uma imagem que representa uma “fatia” plana do objecto em análise sem sobreposições. Normalmente, o conjunto emissor/detector pode ser deslocado para adquirir imagens de planos paralelos consecutivos. Quanto à tomografia por emissão (TCE), o objectivo é a obtenção de imagens bidimensionais a partir da emissão de radiação electromagnética por acção de isótopos radioactivos administrados ao paciente sob a forma de radiofármacos. Neste processo, isótopos radioactivos são caracterizados pela emissão de fotões de Raios-Gama. A concentração de um isótopo em qualquer secção muda com o tempo, o que significa que os dados para construir a imagem de uma secção devem ser adquiridos rapidamente para não haver mudanças de concentração. As técnicas Tomografia Computorizada por Emissão compreendem dois processos (Endo, 2005): emissão de positrões (*Positron Emission Tomography* – PET) e emissão de fotão único (*Single Photon Emission Tomography* – SPECT).

A tomografia de fotão único consiste na obtenção de imagens tridimensionais, adquiridas em diferentes planos, através da medição da actividade dos isótopos previamente administrados ao paciente, que decaem, emitindo radiação gama. Para adquirir os diversos planos utilizam-se câmaras gama que fazem a aquisição de séries de imagens planares ao mesmo tempo que roda à volta do paciente. A principal desvantagem desta técnica prende-se com o tempo necessário para a recolha de dados, a formação da imagem e com a elevada dose de radiofármacos que é necessário administrar para se obter um sinal de boa qualidade.

A emissão de positrões é uma técnica muito importante para a detecção precoce de tumores, permitindo detectar alterações em tecidos e órgãos provocados por estados de doença antes mesmo de parecerem sintomas sérios. Nesta técnica, os radiofármacos administrados ao paciente desintegram-se emitindo positrões de energia cinética da ordem de 1 meV. Se esses positrões estiverem na proximidade de tecidos moles conseguem percorrer alguns milímetros antes de interagirem com electrões da matéria aniquilando-se. Tal, originará dois fotões de energia equivalente a massa de repouso de um electrão emitidos em direcções opostas. Neste processo, o paciente está envolvido por detectores que

devem responder a cada evento proveniente do seu corpo, isto é, a emissão de dois fótons diametralmente opostos em relação ao ponto de emissão.

### 2.2.2 Ressonância magnética

A Ressonância Magnética é uma técnica não evasiva de diagnóstico por imagem que se baseia na interação entre núcleos de certos elementos, que possuem capacidade de rotação e o campo magnético exterior. A ressonância magnética foi desenvolvida por Block e Purcell em 1946, tendo o primeiro sistema sido apresentado em 1975 e as primeiras aplicações clínicas no início dos anos 1980 (Yousef *et al*, 1999). As primeiras observações que estiveram por base aos trabalhos de Block e Purcell devem-se a Rabi que, em 1939, ao colocar moléculas de hidrogénio num campo magnético homogéneo forte, observou que por acção de ondas de rádio de uma dada frequência as moléculas absorviam energia e sofriam um pequeno desvio.

Sempre que os núcleos de um determinado componente possuam um número ímpar de protões, permitem fenómenos de ressonância magnética. Existem vários núcleos que possuem tais características como o de hidrogénio, do carbono 13 (6 protões e 7 neutrões), do sódio 23 (11 protões e 12 neutrões), etc. O hidrogénio, devido a sua abundância nos tecidos sob a forma de água ou gordura e ao forte momento magnético que possui é particularmente importante para a ressonância magnética. Como os tecidos moles são particularmente ricos em água, o sinal emitido é aqui especialmente forte. Qualquer alteração na sua densidade e quantidade de água, alterará o sinal permitindo distinguir o tecido normal do tecido alterado por alguma patologia (Colaço *et al*, 2003).

Trata-se de um método inócuo de aquisição de imagens médicas, não invasivo e que não utiliza radiação ionizante, permitindo a geração rápida de imagens médicas e a visualização em tempo real de batimentos cardíacos, detecção de fluidos, etc. (Chao, 2007). Contudo é um método bastante caro contra-indicado para doentes com *pacemakers*, doentes com estruturas



ferromagnéticas no corpo, doentes em estado crítico ou ventilados e para doentes ansiosos e obesos.

### 2.2.3 Ultrasonografia

A ultrasonografia é um método que se baseia numa técnica de detecção de ecos que consiste na determinação de distâncias a partir do tempo percorrido desde que uma fonte de energia é emitida até ser detectada (Chao, 2007). No caso particular da ultrasonografia, o método consiste na emissão e recepção de ondas sonoras numa frequência acima do limite da audibilidade humana (entre 2.5 a 10 MHz). Para a recepção são utilizados receptores de diferentes frequências para obter as imagens (Enderle *et al*, 2005). Comparativamente com as técnicas de imagiologia médica anteriormente apresentadas, esta técnica é a que apresenta menor precisão e maior susceptibilidade de distorções geométrica dos dados obtidos. Estes fenómenos estão muito dependentes das alterações das condições ambientais do espaço do exame.

Durante os anos 1960 diversas empresas desenvolveram sistemas de ultrasons para captação de imagens de fetos e órgãos internos. O primeiro *scanner* de ultrasons foi desenvolvido Solder na Alemanha em 1965 (Enderle *et al*, 2005). O primeiro sistema comercial, designado por Disonograph, foi desenvolvido em 1968 por McDonald e Brown. Desde essa altura, esta técnica conheceu um grande desenvolvimento sendo possível hoje a obtenção de imagens tridimensionais de forma automática (Figura 2.5).



**Figura 2.5** – Imagens tridimensionais obtida por ultrasonografia

#### 2.2.4 Norma DICOM

Um dos principais problemas associados a aquisição de dados médicos residia na falta de uniformização das imagens médicas. Este problema foi resolvido pela criação de um protocolo de transferência de informação médica designado por DICOM (*Digital Imaging and Communications in Medicine*), que constitui actualmente um standard para equipamentos médicos. Trata-se de um protocolo, criado pelo *American College of Radiology* (ACR) e pelo *National Electrical Manufacturers Association* (NEMA) que visa padronizar a informação e os formatos de imagem obtidas pelos diversos sistemas. Esta norma, cuja primeira versão foi publicada em 1985 com a designação ACR-NEMA, foi criada como resposta aos crescentes desenvolvimentos associados aos sistemas de aquisição de imagens médicas. A norma DICOM permite assim resolver problemas como a transferência de informação entre softwares e sistemas de obtenção de dados de diferentes fabricantes, permitindo também uma fácil organização, catalogação, disponibilização de acesso, conservação de dados, e mais recentemente a facilidade de transmissão em rede permitindo por exemplo, a telemedicina.

A versão do protocolo actualmente em vigor foi publicada em 1993 com a designação DICOM 3.0 e abrange todos os tipos de sistemas comerciais de imagiologia médica, definindo diversos parâmetros standard tais como o nome do paciente, o número de referência, o número do estudo ou exame, datas e relatórios.

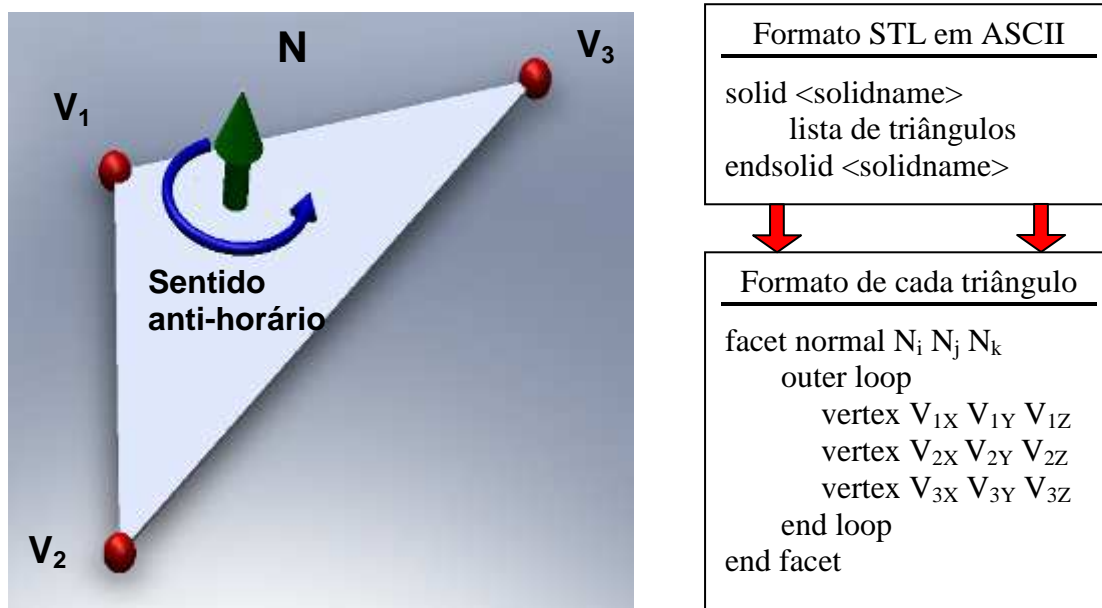
### 2.3 Ficheiros STL

Na biofabricação, uma vez definido, num sistema CAD o modelo médico ou o *scaffold* a fabricar este, deve em seguida ser convertido num formato STL (Stereo-Litography) em que as superfícies são descritas através de uma malha de triângulos semelhante a uma rede de elementos finitos (Figura 2.2) (Almeida, 2006). Os ficheiros STL, desenvolvidos inicialmente pela empresa *3D Systems* em 1987 e que rapidamente se transformou no formato standard de comunicação

com os diferentes sistemas aditivos de fabricação, apresentam-se em dois formatos distintos (Bártolo, 2001; Marsan *et al*, 1998):

- ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*);
- Binário.

Os ficheiros em ASCII (Figura 2.6) principiam-se sempre com a palavra *solid* e terminam com a palavra *endsolid*. Entre estas duas palavras, é feita a definição dos triângulos através da especificação das coordenadas dos seus vértices (Marsan *et al*, 1998). A normal de cada triângulo é um vector unitário que no caso de não estar definindo é gerado de forma automática pela maioria dos softwares existentes.



**Figura 2.6** – Formato STL em ASCII

O formato binário utiliza inteiros e vírgulas flutuantes para a representação numérica da rede triangular. Os primeiros 84 *bytes* são destinados ao cabeçalho (Figura 2.7) e por cada triângulo existente são ocupados mais 50 bytes com as coordenadas x, y e z do vector da normal e dos três vértices. Os ficheiros STL em binário são mais pequenos que os correspondentes ficheiros em ASCII. Recentemente, e aproveitando os 2 *bytes* livres do STL binário foi desenvolvido o

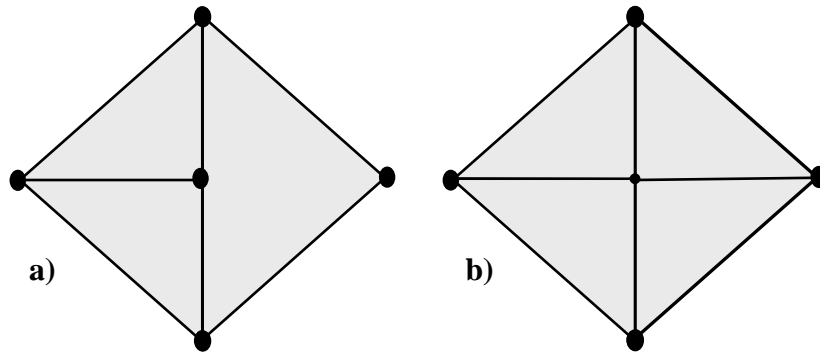
formato cor que permite atribuir informação relativa à cor que cada triângulo pode ter. Esta informação consiste em dizer se para um dado triângulo é atribuída uma cor específica ou não (um ou zero) e por uma escala de intensidades RGB (*Red*, *Green*, *Blue*) de valores compreendidos entre 0 e 31.

O formato STL é gerado pela maioria dos softwares CAD comerciais, sendo bastante simples do ponto de vista topológico. A definição da rede de elementos triangulares que constituem o modelo STL e que aproximam as superfícies do modelo CAD 3D deve obedecer aos seguintes critérios (Alves e Bártolo, 2006; Marsan *et al*, 1998):

1. Regra da orientação dos triângulos: a orientação de cada triângulo é feita pela ordenação dos seus vértices no sentido anti-horário;
2. Regra da adjacência: cada triângulo deve partilhar dois vértices com cada um dos triângulos adjacentes (Figura 2.8).

| Bytes               | Descrição                 |
|---------------------|---------------------------|
| 80                  | Cabeçalho (Ignorado)      |
| 4                   | Número de triângulos      |
| Para cada triângulo |                           |
| 4                   | Componente x da normal    |
| 4                   | Componente y da normal    |
| 4                   | Componente z da normal    |
| 4                   | Coordenada x do vértice 1 |
| 4                   | Coordenada y do vértice 1 |
| 4                   | Coordenada z do vértice 1 |
| 4                   | Coordenada x do vértice 2 |
| 4                   | Coordenada y do vértice 2 |
| 4                   | Coordenada z do vértice 2 |
| 4                   | Coordenada x do vértice 3 |
| 4                   | Coordenada y do vértice 3 |
| 4                   | Coordenada z do vértice 3 |
| 2                   | Bytes livres              |

**Figura 2.7** - Formato STL em binário



**Figura 2.8** – a) Violação da regra da adjacência – triangulação incorrecta. b) Triangulação correcta.

Para a verificação da regra da adjacência devemos ainda ter em consideração um conjunto de princípios de consistência dados por (Alves e Bártolo, 2006):

- O número de triângulos deve ser par;
- O número de arestas deve ser um múltiplo de 3;
- O número de arestas deve ser igual a 1.5 do número de triângulos;
- Sendo  $T$  o número de triângulos, o número de vértices ( $V$ ) é dado por:

$$V = 0.5 \times T + 2$$

Estas condições traduzem-se no cumprimento da regra de *Euler* que para um elemento triangular se traduz por:

$$T + V - A = 2$$

com  $T$  o número de triângulos,  $V$  o número total de vértices e  $A$  número total de arestas.

3. Regra de *Mobius*: no caso de triângulos adjacentes é dada a ordenação dos vértices a direcção de um lado de um triângulo e oposta a direcção do mesmo lado no triângulo adjacente.

Uma vez que os *softwares* comerciais de CAD utilizam em regra algoritmos pouco robustos para a geração de ficheiros STL estes apresentam frequentemente erros do tipo (Marsan *et al*, 1998):

- Existência de lacunas ou triângulos mal definidos;
- Existência de triângulos distorcidos;
- Existência de faces degeneradas. A degeneração pode ser de dois tipos:
  1. Degeneração topológica, quando dois ou mais vértices de uma face não são coincidentes;
  2. Degeneração geométrica, quando todos os vértices de uma face são distintos mas não colineares.
- Sobreposição de faces;
- Intercessão incorrecta;

que devem ser analisados e corrigidos, de maneira a não originarem problemas durante a etapa de fatiamento (*slice*) e a causarem problemas na fase de fabricação.

## **2.4 Fatiamento do modelo STL**

Uma vez obtido o ficheiro STL, este deve ser em seguida convertido numa série de camadas, secções transversais finas através da intersecção de uma série de planos x e y sobre o modelo tridimensional (Dolenc e Makela, 1994). De notar, que a definição correcta dos modelos a produzir dependerá do número de

elementos triangulares utilizado na definição do modelo STL. Contudo, ficheiros com maior número de triângulos requerem maior tempo de processamento.

De modo a aumentar a rapidez de fatiamento dos modelos STL e aumentar a precisão dimensional através da redução do chamado efeito escada, têm sido propostos vários algoritmos de que se destacam os seguintes (Sun *et al*, 2007; Zhou *et al*, 2004; Choi e Kwok, 2002):

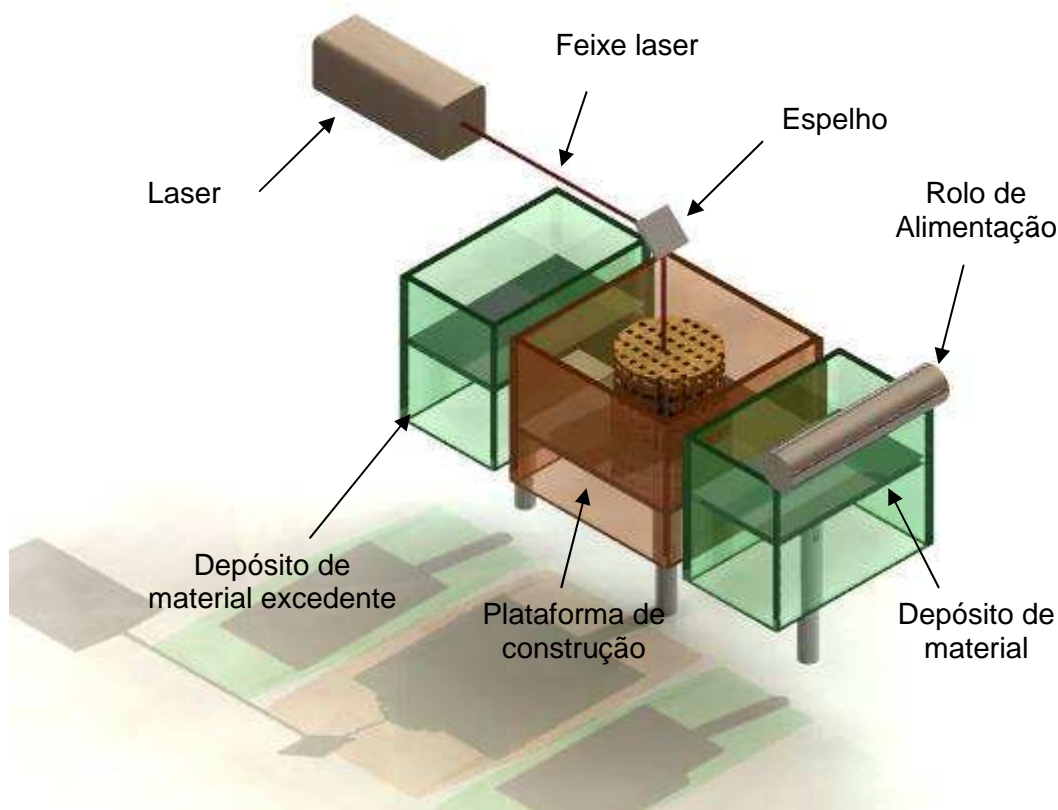
- Seccionamento adaptativo com superfícies de camada inclinadas. Esta estratégia permite uma aproximação muito grande entre o ficheiro CAD original e o ficheiro relativo ao seccionamento. Contudo, a generalidade dos sistemas de prototipagem rápida não permite a execução de camadas com superfície inclinada
- Seccionamento adaptativo com espessuras de camada variável. Tal como a estratégia de seccionamento anterior, o seccionamento adaptativo de espessura variável permite uma redução no tempo de produção, através da diminuição do número de camadas mediante o ajustamento selectivo das espessuras de acordo com requisitos de precisão. Esta estratégia permite igualmente o aumento da qualidade superficial das peças obtidas. Por outro lado, tal como no caso anterior a grande limitação desta estratégia reside no facto da generalidade dos sistemas de prototipagem rápida não permitir a execução de camadas com espessura variável.
- Seccionamento de ficheiros STL de grande dimensão baseados na técnica *Plick-and-Drop*. Esta estratégia permite o seccionamento de ficheiros de grande dimensão sem constrangimentos ao nível da memória do computador, permitindo o processamento de ficheiros STL com elevada dimensão, assim como espessuras de camada muito reduzidas. O excessivo tempo de processamento constitui a principal desvantagem destas estratégias de seccionamento.

## 2.5 Processos aditivos

### 2.5.1 Sinterização

O processo de sinterização selectiva por *laser* (SLS -*Selective Laser Sintering*), foi desenvolvido em meados dos anos 1980 por Deckard, Bourell e Beman na Universidade do Texas em Austin (EUA) e posteriormente comercializada pela empresa DTM recentemente adquirida pela 3D Systems (Deckard, 1986).

Este processo (Figura 2.9), permite produzir modelos físicos, camada a camada, utilizando para o efeito materiais em pó. O pó é processado num ambiente inerte e termicamente controlado, no interior de uma câmara de processamento, atingindo uma temperatura próxima da fusão por acção de um laser CO<sub>2</sub> ou Nd:YAG emitindo radiação infravermelha (Chua *et al*, 2003).



**Figura 2.9** – Esquema do processo Sinterização

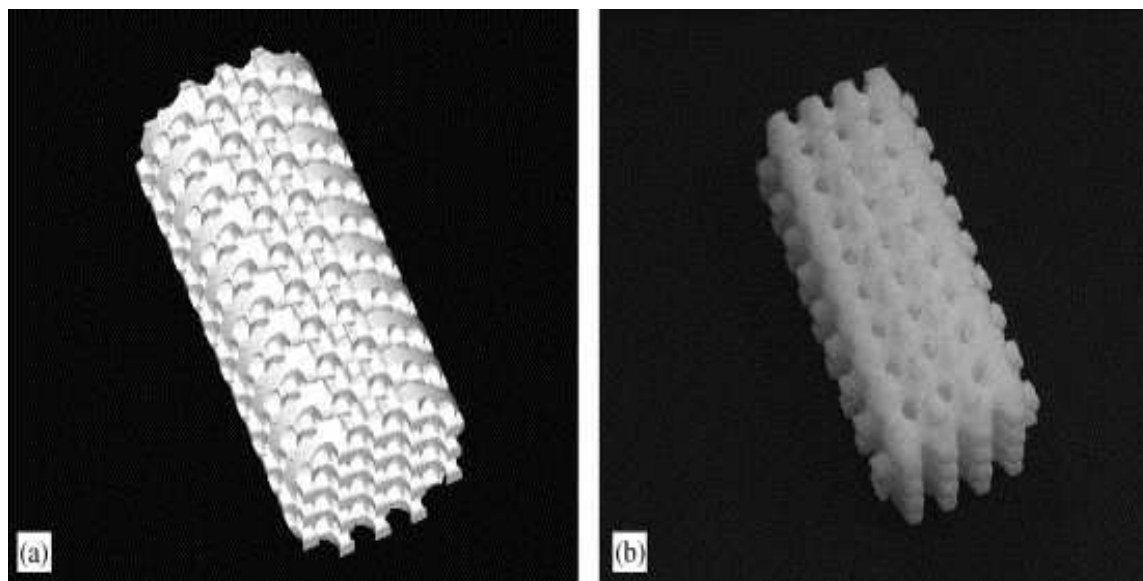


O processo de construção compreende três fases principais (Chua *et al*, 2003):

- Uma camada de material em pó é depositada na zona de construção por intermédio de um rolo de alimentação/nivelamento.
- O feixe *laser* varre cada camada de pó de acordo com os dados CAD do modelo, sinterizando selectivamente o material. O pó não irradiado serve de suporte à camada seguinte evitando igualmente possíveis deslocamentos do protótipo.
- Após a sinterização de uma camada a plataforma onde o modelo é construído desce uma distância igual à espessura da camada seguinte e é colocada uma nova camada de material em pó pelo rolo, repetindo-se o processo.

A sinterização selectiva por *laser* tem sido utilizada para a produção de *scaffolds* numa grande variedade de materiais poliméricos, cerâmicos e compósitos cerâmico-polímero. A resolução obtida por esta técnica é de 500  $\mu\text{m}$ , sendo neste aspecto a tecnologia aditiva de biofabricação com pior desempenho (Bártolo *et al*, 2007).

Neste domínio, um trabalho particularmente importante foi desenvolvido por Williams (Williams *et al*, 2005) que utilizou o processo SLS para produzir *scaffolds* em policaprolactona (PLC) sobre os quais foram colocados fibroblastos (Figura 2.10). Análises subsequentes, realizadas *in vivo*, mostraram que estes *scaffolds* induziam a formação de tecido para além de apresentarem propriedades próximas da do osso trabecular.



**Figura 2.10** - *Scaffold* obtido em PCL por SLS. a) Modelo CAD. b) *Scaffold* físico (Williams *et al*, 2005)

Lee e Barlow (1996) utilizaram partículas de fosfato de cálcio revestidas de material polimérico para produzirem igualmente *scaffolds*. As estruturas finais sofreram após o processo de fabricação uma etapa final de remoção de ligante e foram infiltradas com uma solução de fosfato de cálcio ou um cimento inorgânico a base de ácido fosfórico, produzindo-se assim implantes ósseos à base de fosfato de cálcio. A utilização da sinterização para a produção de *scaffolds* em material biocerâmico foi igualmente estudada por Hao *et al* (2005) que analisou a utilização do processo SLS para produzir *scaffolds* em hidroxiapatite (HA) e polietileno de alta densidade, neste caso foram igualmente testados diferentes parâmetros de processamento, tais como a velocidade de varrimento, e a potência do *laser*, e avaliado o seu efeito sobre a morfologia das estruturas sinterizadas. Outros importantes trabalhos devem-se Lee, Barlow e a Tan (Tan *et al*, 2003) sobre *scaffolds* em compósito PEEK-HA.

As principais vantagens e desvantagens desta tecnologia são apresentadas na Tabela 2.2.

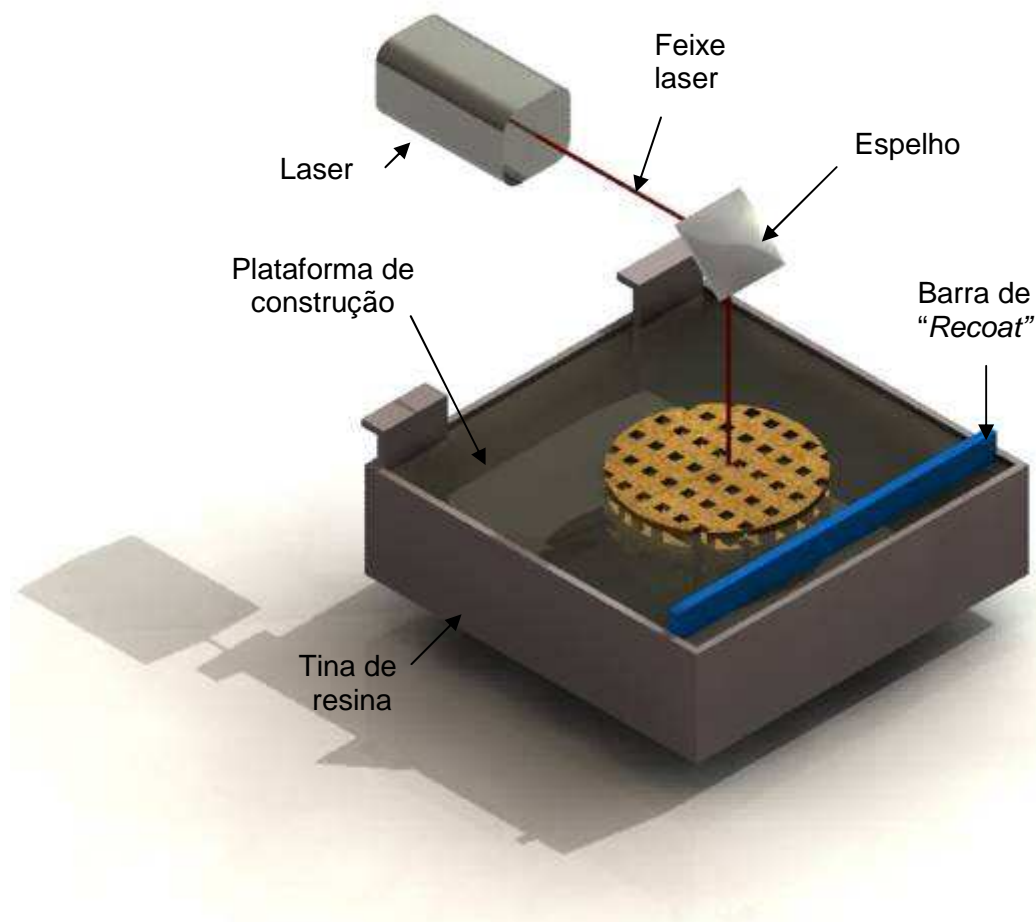
**Tabela 2.2 – Vantagens e desvantagens do processo SLS**

| <b>Vantagens</b>                                   | <b>Desvantagens</b>   |
|--|---|
| - Não necessita de suportes estruturais;           | - Elevadas temperaturas de processamento;                   |
| - Grande diversidade de materiais;                 | - Material aprisionado;                                     |
| - Peças de elevada resistência mecânica e térmica; | - Ciclos de aquecimento e arrefecimento da câmara elevados; |
| - Definição rápida das camadas;                    | - Distorções e empenos;                                     |
| - Elevada porosidade (microporosidade).            | - Consumo de energia elevado durante a sinterização;        |

### 2.5.2 Estereolitografia

A estereolitografia, concebida por Hull em 1984 (Figura 2.11) foi o primeiro sistema de fabrico aditivo a ser comercializado. Este processo, consiste na construção de modelos físicos através da solidificação camada a camada de resinas foto-sensíveis e compreende duas estratégias de fabricação (Bártolo, 2007; Bártolo e Jardini, 2004):

- Processos de irradiação directa, que envolvem a utilização de um feixe *laser* para efectuar a polimerização ponto a ponto de cada camada;
- Processo de irradiação por máscara.



**Figura 2.11** – Processo de estereolitografia.

Os processos de irradiação directa classificam-se ainda em (Matias, 2007):

- Processos envolvendo radiação ultravioleta – estereolitografia convencional;
- Processos envolvendo radiação infravermelha – estereolitografia de CO<sub>2</sub>;
- Processos envolvendo radiação ultra violeta e infravermelha – estéreo-termo-litografia.

Os sistemas de estereolitografia convencional consistem num computador que serve de unidade de controlo do equipamento, numa tina contendo uma resina termoendurecível possuindo uma determinada concentração de foto-

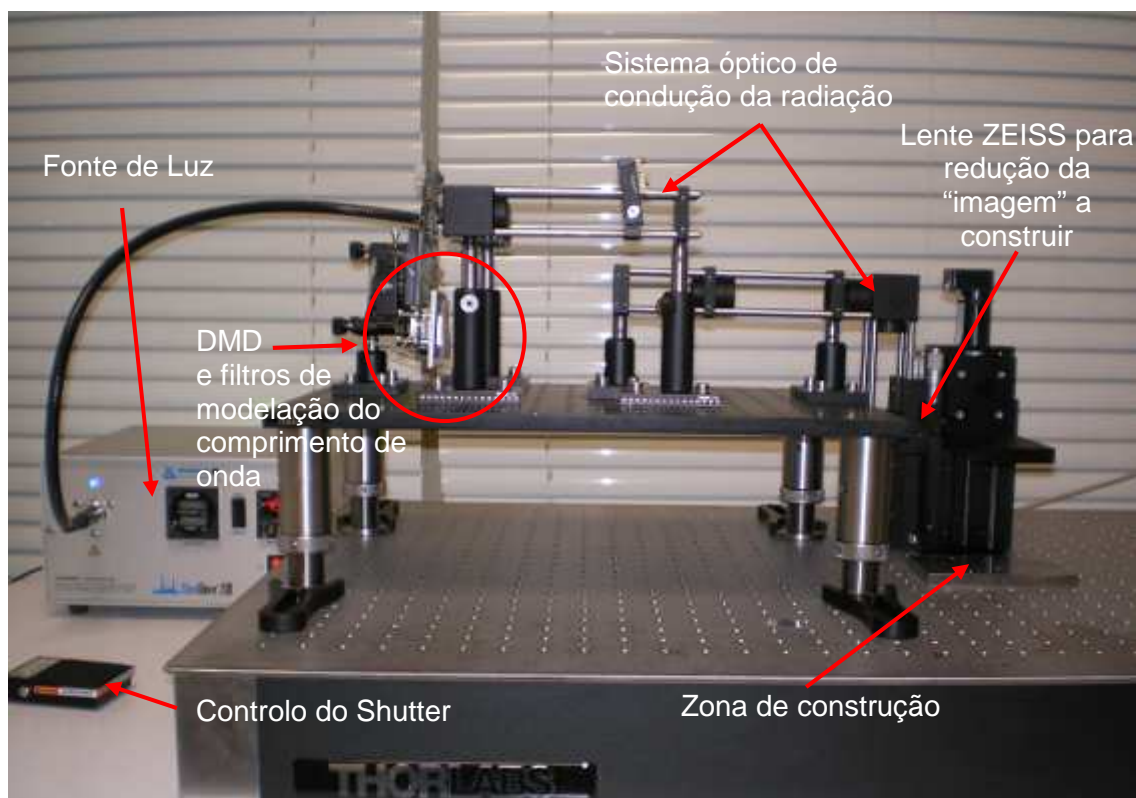
iniciador, numa plataforma de trabalho móvel, num *laser* emitindo radiação ultravioleta e num sistema óptico para dirigir o feixe de radiação. Uma vez que os modelos são construídos no interior de um meio líquido é necessário construírem-se suportes estruturais (Bártolo, 2001). Estes, para além de suportarem convenientemente as camadas que se encontrem em suspensão são também utilizados para fixar o modelo ao elevador e compensarem qualquer desalinhamento angular existente entre a plataforma de trabalho e a superfície da resina (Bártolo, 2001).

Uma vez obtido o modelo, este deve ser sujeito a uma operação de pós-cura de modo a completar-se o processo de solidificação dos modelos, conferindo-lhes máxima resistência através, por exemplo da sua exposição a uma intensa radiação ultravioleta (Bártolo, 2006). Posteriormente, o modelo pode ser submetido a operações de pós-processamento melhorando o seu aspecto final e a sua funcionalidade.

O processo de estereolitografia por CO<sub>2</sub> utiliza um feixe de radiação infravermelha para selectivamente solidificarem a resina líquida contendo uma determinada concentração de termo-iniciador (Jardini *et al*, 2004, 2003). Este processo apresenta alguns problemas no tocante a localização da cura devido a mecanismos de difusão de espécies reactivas e a fenómenos de condução térmica que têm vindo a ser solucionados mediante a adição de quantidades apropriadas de sílica (Jardini *et al*, 2004, 2003).

O processo de estere-termo-litografia utiliza simultaneamente efeitos térmicos, produzidos por exemplo por radiação infravermelha, e radiação ultravioleta, para iniciar o processo de cura de uma resina que contém pequenas quantidades de termo-iniciador e foto-iniciador (Bártolo e Mitchell, 2003; Bártolo, 2001). A concentração de ambos os iniciadores deve ser criteriosamente seleccionada de forma a se evitar qualquer mecanismo de polimerização, devido apenas aos efeitos em separado da temperatura e da radiação ultravioleta. Contudo, e na zona de intersecção dos dois efeitos que a população de radicais é suficiente para iniciar a reacção (Bártolo e Mitchell, 2003; Bártolo, 2001). A temperatura é utilizada para produzir radicais através da fragmentação de termo-iniciadores e simultaneamente para aumentar a taxa da reacção.

O processo de irradiação por máscara foi desenvolvido por Pomerantz e comercializado até ao ano 2000 pela empresa israelita Cubital sob a designação de *Solid Ground Curing* (SGC) (Pomerantz *et al*, 1991, 1990). Tal como nos processos estereolitográficos de irradiação directa, também este processo utiliza resinas fotosensíveis que polimerizam por acção da radiação ultravioleta. Neste caso, cada camada de resina é solidificada por exposição a radiação ultravioleta produzida por uma lâmpada através de uma máscara com áreas transparentes correspondentes à secção do modelo a fabricar. A resina remanescente e não curada é em seguida removida e substituída por cera. Em seguida, tanto a resina como a cera são sujeitas a uma operação de fresagem de modo a conferir uma espessura uniforme a cada camada. Após todas as camadas terem sido construídas, o resultado é um modelo embebido no interior de um bloco de cera. Finalmente, a cera é removida revelando o modelo final. Cada máscara correspondente a uma secção transversal do modelo é produzida numa placa de vidro carregável electrostaticamente usando técnicas de impressão ionográfica. A estratégia de irradiação por máscara tem sido igualmente explorada na produção de micro componentes, através de um processo designado por técnica integrante de microestereolitografia (Matias, 2007). Esta técnica, utiliza um gerador padrão dinâmico para modelar o feixe de luz proveniente de uma fonte de radiação segundo a imagem de cada camada a construir (Figura 2.12). Esta imagem é em seguida reduzida e focada sobre a superfície da resina a solidificar, através de um sistema óptico apropriado. O processo caracteriza-se por elevadas velocidades de construção e ausência de polimerizações indesejadas devido ao facto da densidade do fluxo de luz incidente sobre a superfície da resina ser baixo, permitindo resoluções da ordem dos 5  $\mu\text{m}$ . Uma das poucas empresas a comercializarem este tipo de processo de microestereolitografia é a empresa alemã MicroTEC que utiliza um *laser* de Excimero no seu processo designado por *Rapid Micro Product Development*.



**Figura 2.12** – Sistema de microestereolitografia integrante em desenvolvimento no Instituto Politécnico de Leiria.

Os processos estereolitográficos têm sido explorados por muitos grupos de investigação em engenharia de tecidos.

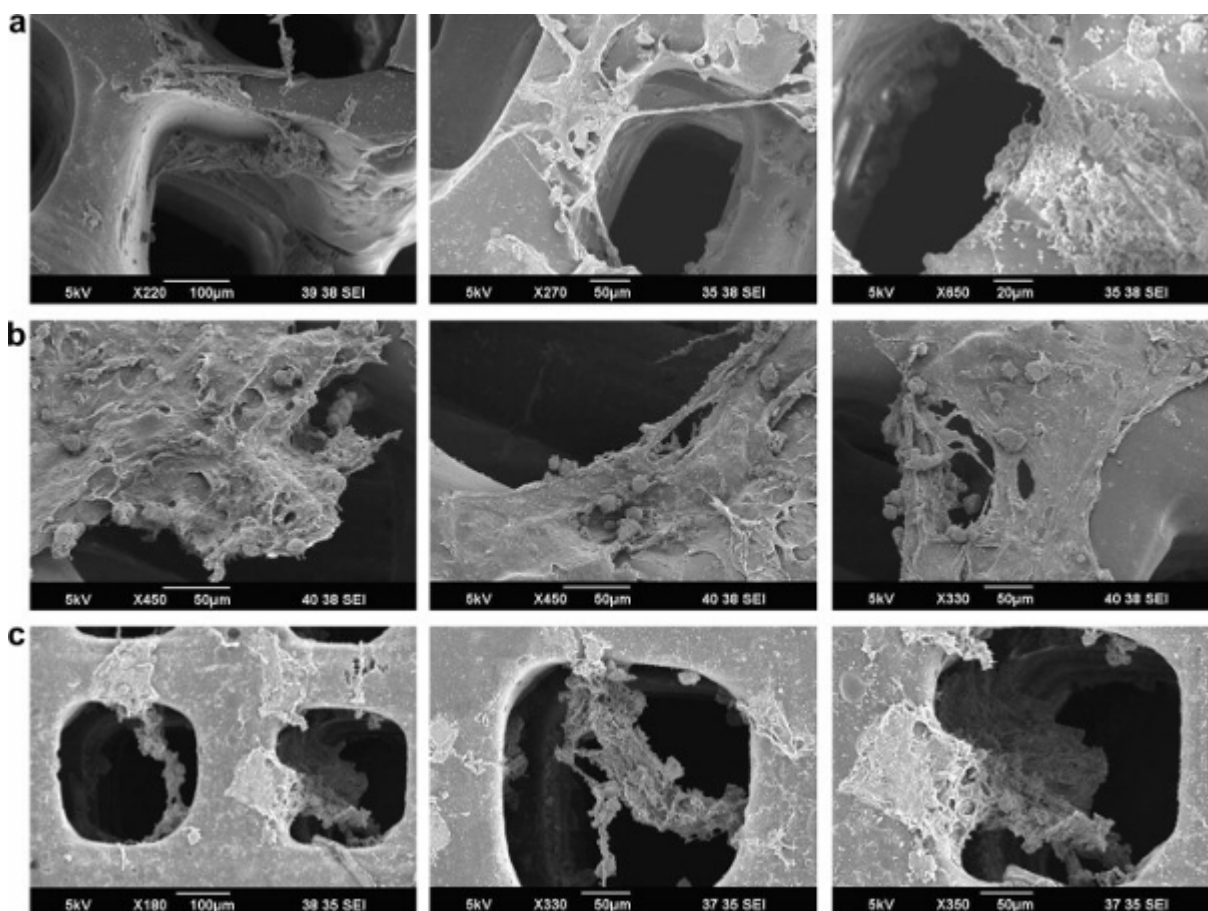
Levy (Levy *et al*, 1997) utilizou esta tecnologia com sucesso para a fabricação directa de *scaffolds* cerâmicos em hidroxapatite (HA) para tratamento de lesões na zona orbital óssea. Neste caso, a resina é utilizada como ligante das partículas de hidroxapatite, pelo que, de forma semelhante à sinterização, os modelos obtidos são submetidos a uma operação de remoção de ligante e de sinterização para consolidação. Griffith e Halloran (Griffith e Halloran, 1996) utilizaram uma abordagem semelhante para a produção de *scaffolds* cerâmicos utilizando suspensões de alumina, nitreto de silicone e partículas de sílica com resina fotosensível. Após a construção do *scaffold*, o ligante polimérico foi removido por pirólise e as estruturas cerâmicas sinterizadas. Chu (Chu *et al* 2001) desenvolveu uma técnica de moldes perdidos para a produção de implantes com uma determinada configuração de canais e estratégia de interconexão entre canais. A estereolitografia foi, neste caso utilizada para a produção de moldes

com uma configuração igual ao negativo do implante sobre os quais foi vazada uma suspensão de resina altamente carregada com partículas de hidroxiapatite. O molde e o ligante polimérico foram igualmente removidos por pirólise e o *scaffold* em hidroxiapatite submetido a um processo de sinterização. Matsuda e Mizutani (Matsuda e Mizutani, 2002) desenvolveram um co-polímero biodegradável e foto-sensível com base em resinas acrílicas e policaprolactona para a produção de *scaffolds* poliméricos.

Mais recentemente, as técnicas estereolitográficas têm sido exploradas para a produção de hidrogéis para a engenharia de tecidos. Hidrogéis são redes poliméricas altamente reticuladas e bastante hidrofílicas armazenando grande quantidade de água (Miller e West, 2007). Essas estruturas são formadas pela reticulação física ou covalente de uma solução polimérica líquida transformando-a num sólido hidrogel. Uma grande gama de materiais podem ser utilizados para produzir tais estruturas, nomeadamente a agarose, o dextrano, o polietileno-glicol, o álcool polivinílico o poli-hidroxi-etilmetacrilato, etc. Neste caso, os foto-iniciadores utilizados devem possuir baixa citotoxicidade, possibilitando a polimerização de suspensões poliméricas contendo células, permitindo assim o seu encapsulamento. Como exemplos de células que têm sido encapsuladas com sucesso em hidrogéis podemos referir: fibroblastos, epatócitos, condrócitos, células neuronais, etc. (Miller e West, 2007).

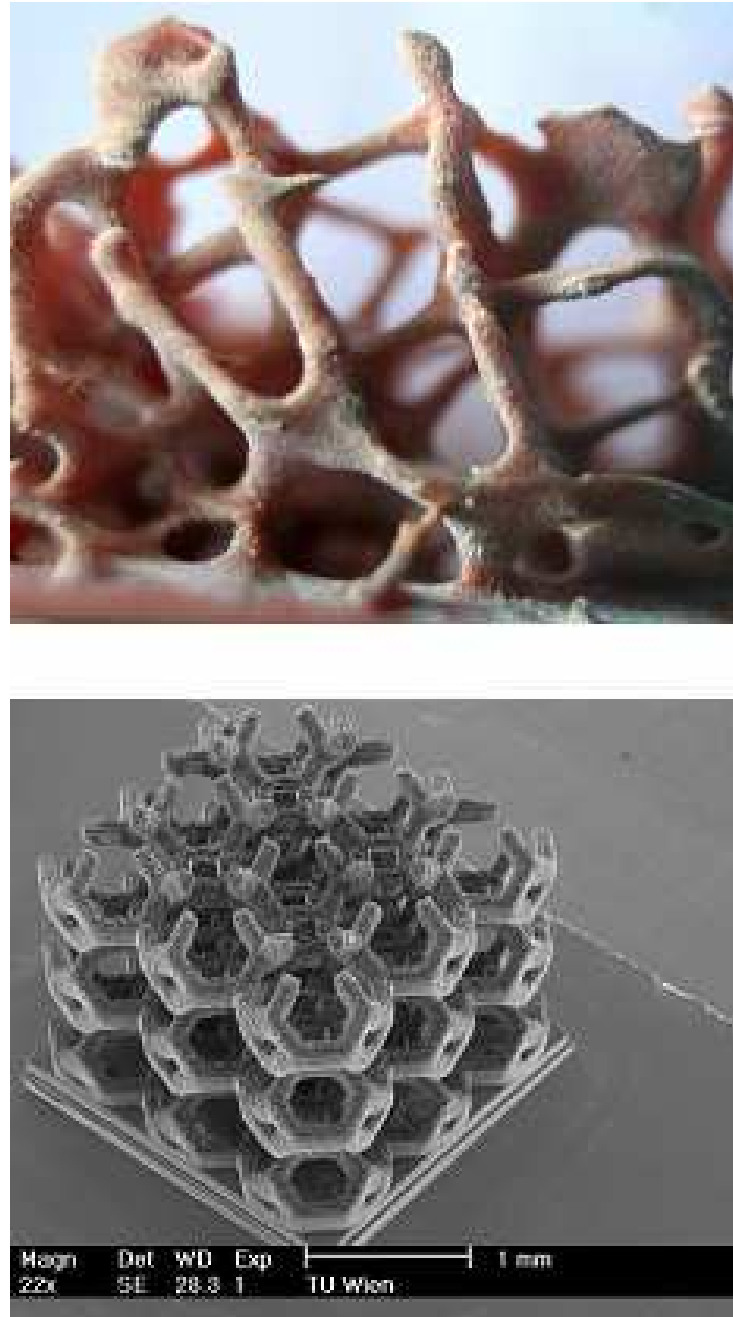
Uma das principais dificuldades na utilização de hidrogéis em engenharia de tecidos prende-se com a sua baixa resistência à adesão celular devido à sua baixa absorção de proteínas. Muito embora apresentem excelente biocompatibilidade e permitam o encapsulamento de células, este facto é limitador da sua utilização em engenharia de tecidos. Contudo, é já possível actualmente modificar hidrogéis biologicamente inertes com peptídeos, proteínas, ou polissacarídeos que funcionam como mediadores de interações biológicas específicas (Miller e West, 2007). A utilização de hidrogéis tanto à escala macro como à escala micro tem sido largamente explorada nos últimos anos. Na Figura 2.13 mostra-se o processo de proliferação celular de fibroblastos sobre um *scaffold* em polipropileno-fumarato produzido por microestereolitografia.





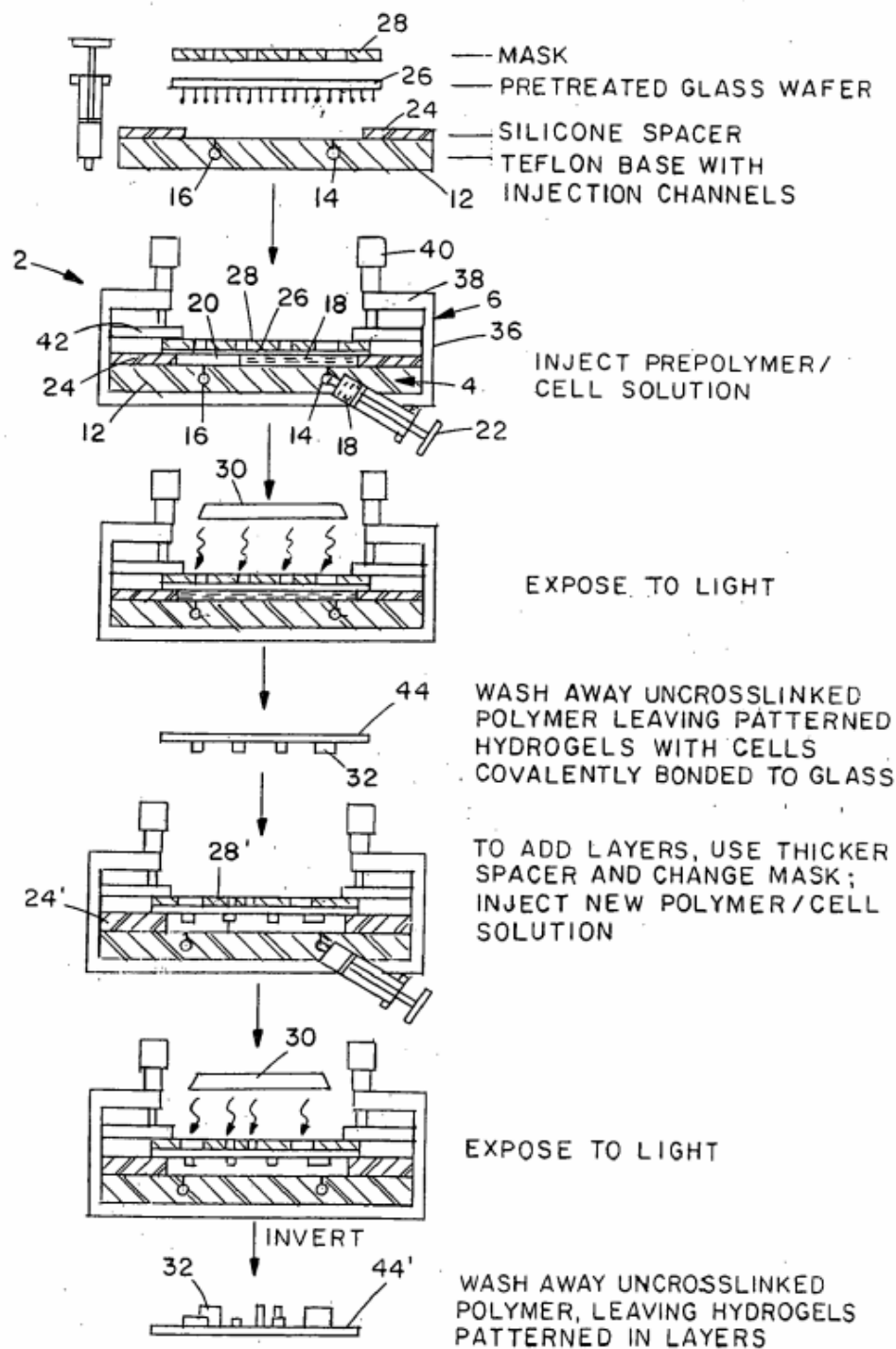
**Figura 2.13** - Cultura celular num *scaffold* obtido por microestereolitografia em polipropileno-fumarato (a) imagem obtida por microscopia electrónica de varrimento (*Scanning Electronic Microscopy* - SEM) após 4 dias da deposição das células. (b) imagem SEM após 1 semana da deposição das células. (c) imagem SEM após 4 semana da deposição das células (Jin *et al*, 2007).

Stampfl *et al* (2007) exploraram recentemente uma técnica microesterolitográfica envolvendo, contrariamente aos processos convencionais, um mecanismo de iniciação bifotónica para a produção de *scaffolds* para aplicações ósseas (Figura 2.14). Para tal, foi desenvolvida uma formulação polimérica apropriada contendo uma resina de base acrílica, gelatina e partículas de hidroxiapatite. Os *scaffolds* produzidos possuíam poros entre 200 e 500 µm, as resoluções obtidas foram inferiores a 300 nm e observou-se a adesão e proliferação de osteoblastos.



**Figura 2.14** – Scaffold obtidos por microestereolitografia (Stampfl *et al*, 2007)

Várias patentes descrevendo estratégias para a utilização da estereolitografia na produção de *scaffolds* têm sido igualmente publicadas (Wicker *et al*, 2006; Bhatia *et al*, 2005; Schmid *et al*, 2005). Na Figura 2.15 ilustra-se um processo para a produção de *scaffolds* contendo células através de um mecanismo de irradiação por máscara de uma solução polímero/células.



**Figura 2.15** – Processo de fabricação de *scaffolds* para engenharia de tecidos envolvendo mecanismos de irradiação directa de soluções polímero/célula (Bhatia *et al*, 2005)

Algumas das principais vantagens e desvantagens do processo de estereolitografia são apresentadas na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Vantagens e desvantagens da estereolitografia

| Vantagens   | Desvantagens                                |
|---|---|
| - Possibilidade de obtenção de modelos de geometrias complexas; | - Necessidade de pós-cura;                  |
| - Boa precisão dimensional;                                     | - Necessita de suportes estruturais;        |
|   | - Contrações e empenos dos modelos obtidos; |
|   | - Utilização de <i>lasers</i> .             |

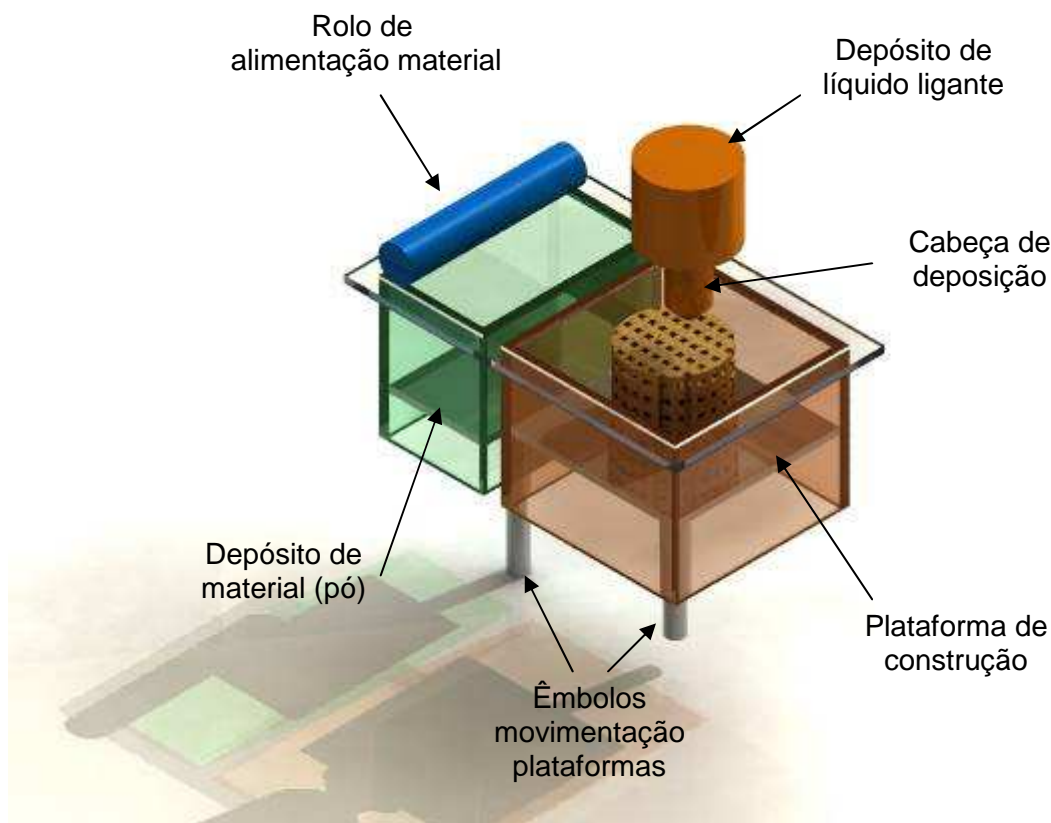
### 2.5.3 Inkjet Printing

As técnicas de *Inkjet Printing* para biofabricação compreendem duas estratégias (Bártolo, 2001; Carrión, 1997):

- Deposição de ligante sobre material em pó (impressão 3D);
- Deposição directa do material através da formação de um jacto.

A impressão 3D (3DP – *Three dimensional Printing*) foi desenvolvida por Sachs e Cima no MIT (*Massachusetts Institute of Technology*) que a licenciou para aplicações no domínio da engenharia de tecidos à empresa Therics (Sachs *et al*, 1994, 1993). Esta tecnologia (Figura 2.16) envolve duas etapas fundamentais. Na primeira etapa, distribui-se uma camada uniforme de pó sobre a superfície de trabalho. Na segunda etapa, é depositado de forma selectiva um material aglutinante utilizando-se uma tecnologia semelhante às das impressoras a jacto de tinta (Chua *et*

al, 2003). O material não aglomerado desempenha durante a fase de construção uma acção de suporte.

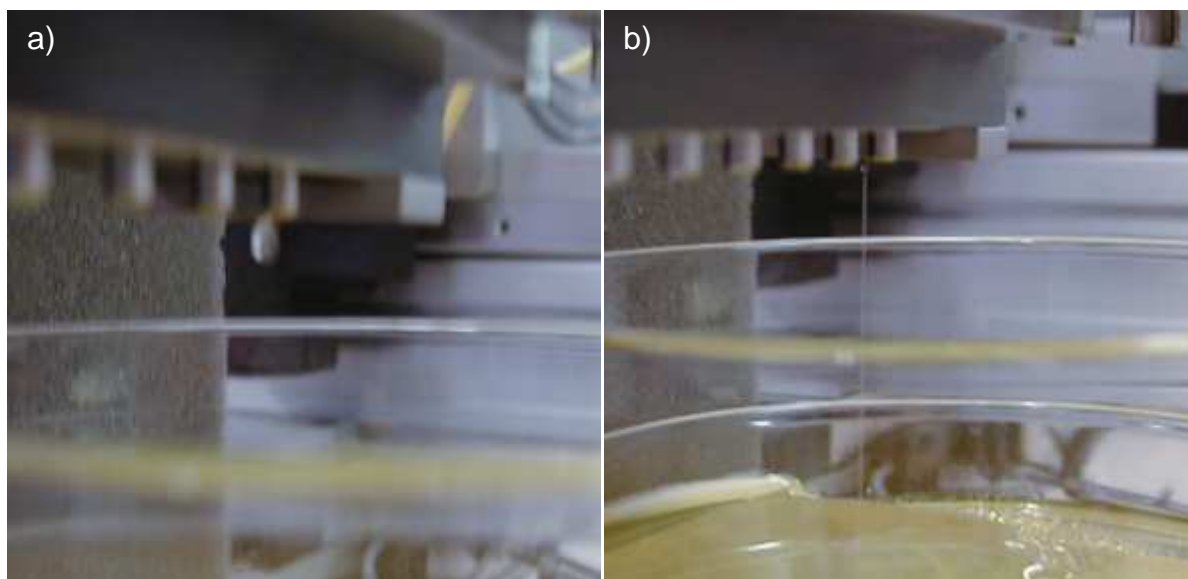


**Figura 2.16** – Processo de impressão 3D

Os principais materiais utilizados para aplicações em engenharia de tecidos são a policaprolactona, o amido, o ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido poliglicólico (PGA), misturas de policaprolactona e hidroxiapatite, e misturas policaprolactona e trifosfato de cálcio. O processo permite, uma vez que se utiliza material em pó, induzir uma certa microporosidade, e em algumas aplicações o ligante utilizado é água. As resoluções tipicamente obtidas são de 300  $\mu\text{m}$ . Os modelos, uma vez obtidos podem ser submetidos nas operações de pós-processamento destinadas por exemplo, à remoção do ligante.

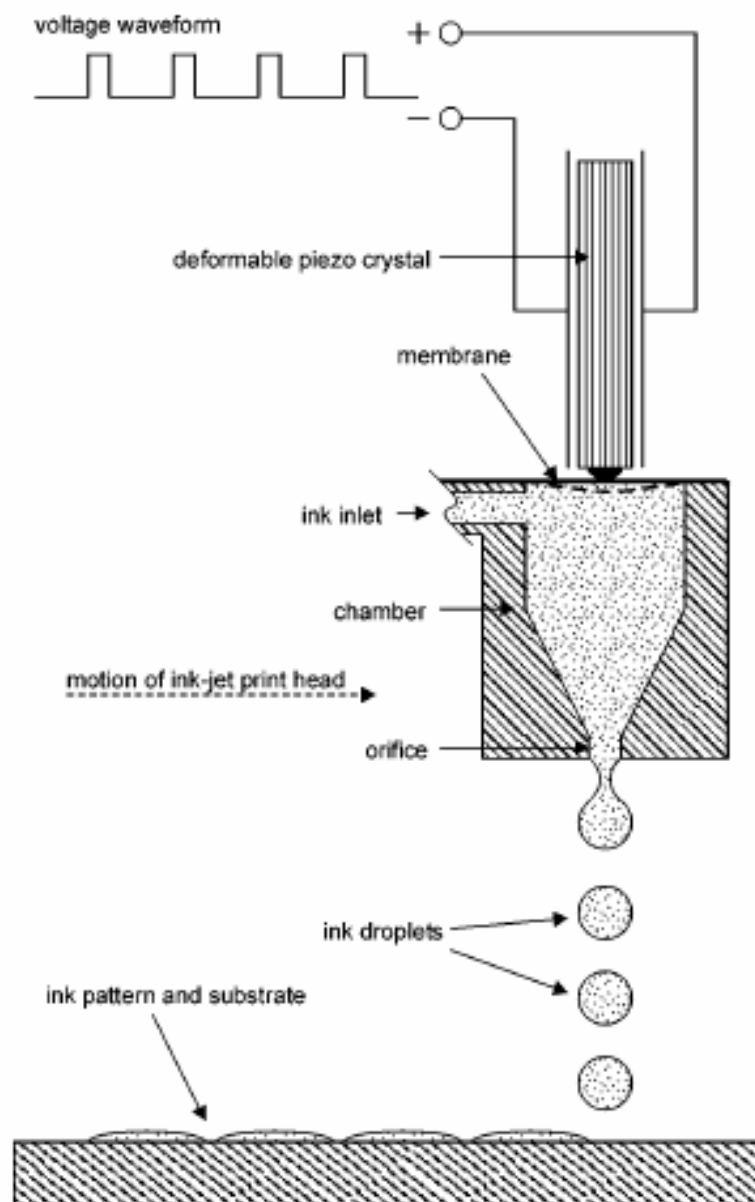
A segunda estratégia de construção envolve um princípio de deposição semelhante à impressão 3D só que, o material depositado corresponde ao próprio material de construção. Esta estratégia baseia-se numa tecnologia desenvolvida nos anos 1970 e utilizada nas impressoras de jacto de tinta, que consiste na formação de

um jacto contínuo ou na deposição de partículas “*drop-on-demand*” (Figura 2.17) (Heinzl e Hinz, 1984). No primeiro caso, a geração de gotas é muito rápida (frequências de 60kHz) e são utilizados fluidos de muito baixa viscosidade (Venuvinod e Weiyin, 2004). No segundo caso, a geração de gotas é mais lenta (frequências entre 5 e 6 kHz) e podem ser utilizados fluidos de viscosidade superior ao caso anterior (Venuvinod e Weiyin, 2004).



**Figura 2.17** – a) Estratégia de deposição “*drop-on-demand*”, b) estratégia de deposição por jacto contínuo

O mecanismo mais comum de formação de partículas para aplicações em biofabricação corresponde ao chamado método da membrana (Figura 2.18) (Venuvinod e Weiyin, 2004). Nesse caso, o material é fornecido a uma câmara de deposição, limitada na sua parte superior por uma membrana em contacto com um cristal piezoeléctrico deformável. Esse cristal, por aplicação de uma diferença de potencial, induz deformação na membrana que por seu turno força a saída do material.



**Figura 2.18** – Método de membrana para a formação de partículas (Venuvinod e Weiyin, 2004).

A impressão 3D é utilizada comercialmente pela empresa Therics para a produção de substitutos ósseos em hidroxiapatite, amido e compósitos biocerâmico-biopolímero, sob a designação *Theriform* (Figura 2.19). Estes substitutos ósseos, aprovados pela *Food and Drug Administration* dos EUA, são já utilizados em aplicações clínicas.



**Figura 2.19** – Substitutos ósseos Theriform

Kim (Kim *et al*, 1998) utilizou a impressão 3D para produzir *scaffolds*, utilizando pó de Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) misturado com partículas de sal e um solvente orgânico adequado. As partículas de sal foram lixiviadas com água destilada. Uma vez obtidos os *scaffolds*, foram introduzidos hepatócitos tendo-se observado mecanismos de proliferação celular.

Zeltinger (Zeltinger *et al*, 2001) investigou a influência do tamanho do poro e da porosidade na adesão e proliferação celular, utilizando um sistema de impressão 3D. Para tal, foram produzidos *scaffolds* de ácido poliláctico em forma de disco com 10 mm de diâmetro e 2 mm de altura. Os *scaffolds* foram produzidos com duas porosidades diferentes (75% e 90%) e quatro distribuições diferentes relativamente ao tamanho dos poros (<38, 38-63, 63-106 e 106-150  $\mu\text{m}$ ), e testados com culturas celulares de fibroblastos dérmicos caninos, células



musculares vasculares e células microvasculares epiteliais. Os resultados demonstraram a viabilidade desta tecnologia em engenharia de tecidos.

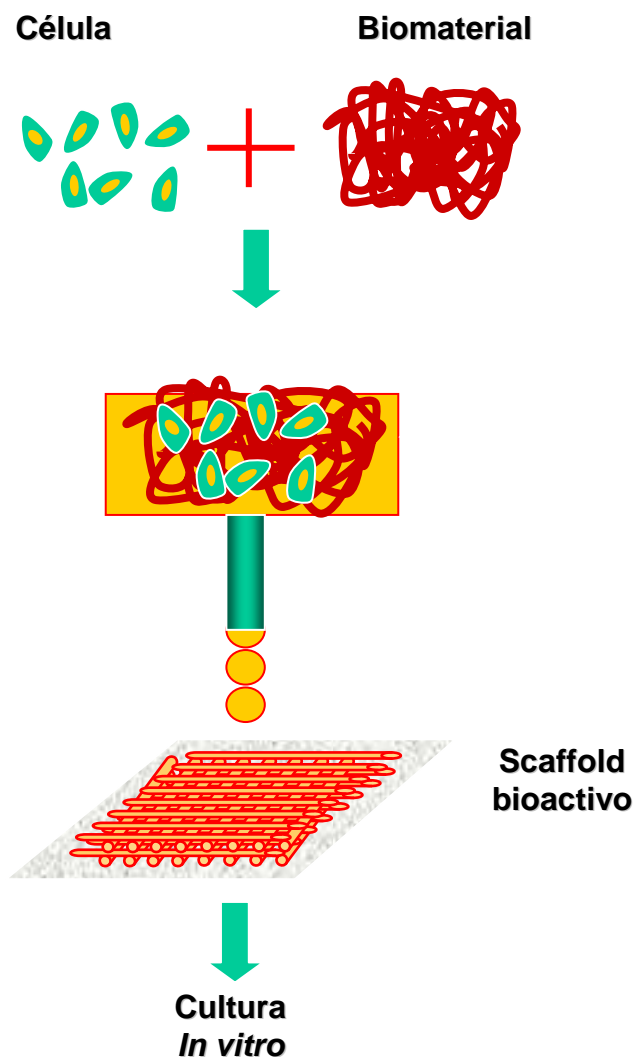
Lam (Lam *et al*, 2002) desenvolveu uma combinação de pós baseados em amido de milho (50%), dextrano (30%) e gelatina (20%) agregados através da impressão de água destilada. Foram produzidos *scaffolds* cilíndricos com 12,5 mm de diâmetro e 12,5 mm de altura e infiltrados com diferentes quantidades de uma solução contendo 75% de ácido poliláctico (PLA) e 25% de policaprolactona (PCL) em diclorometano para melhoria das suas propriedades mecânicas.

Sachlos (Sachlos *et al*, 2003) utilizou a impressão 3D para produzir *scaffolds* de colagénio com morfologia interna complexa utilizando uma abordagem indirecta. Para tal, depositou sobre um molde (com a geometria do negativo do *scaffold*), uma dispersão de colagénio. O conjunto foi congelado e em seguida dissolvido em etanol e o *scaffold* seco com dióxido de carbono líquido.

Outros importantes trabalhos de investigação, como os de Taboas (Taboas *et al*, 2003), Limpanuphap e Derby (Limpanuphap e Derby, 2002) e Park (Park *et al*, 1998), exploraram igualmente as capacidades da impressão 3D em engenharia de tecidos.

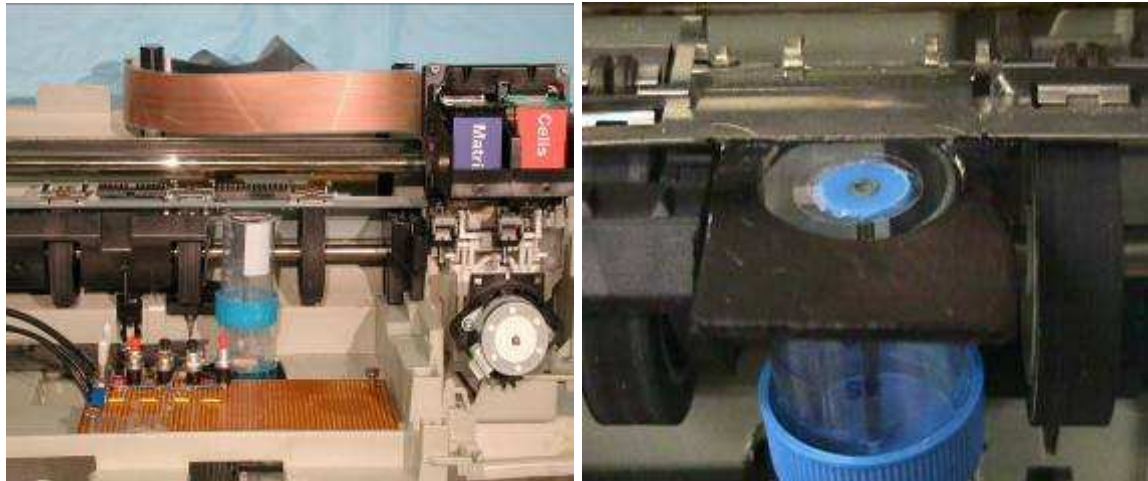
Vários outros investigadores têm vindo a explorar o conceito de bioimpressão (Figura 2.20). Este conceito, consiste na preparação de uma solução célula/biomaterial e através da formação de um jacto ou de uma estratégia “*drop on demand*” produzir um *scaffold* bioactivo. As principais vantagens apresentadas por esta estratégia são (Bártolo *et al*, 2007; Mironov *et al*, 2003):

- Controlo sobre a densidade celular e a distribuição espacial de células;
- Deposição e migração de células assistida, facilitando a construção de *scaffolds* espessos;
- Incorporação de materiais híbridos, factores de crescimentos e nutrientes produzindo-se *scaffolds* heterogéneos;
- Tecnologia consistente, automática e reprodutível.

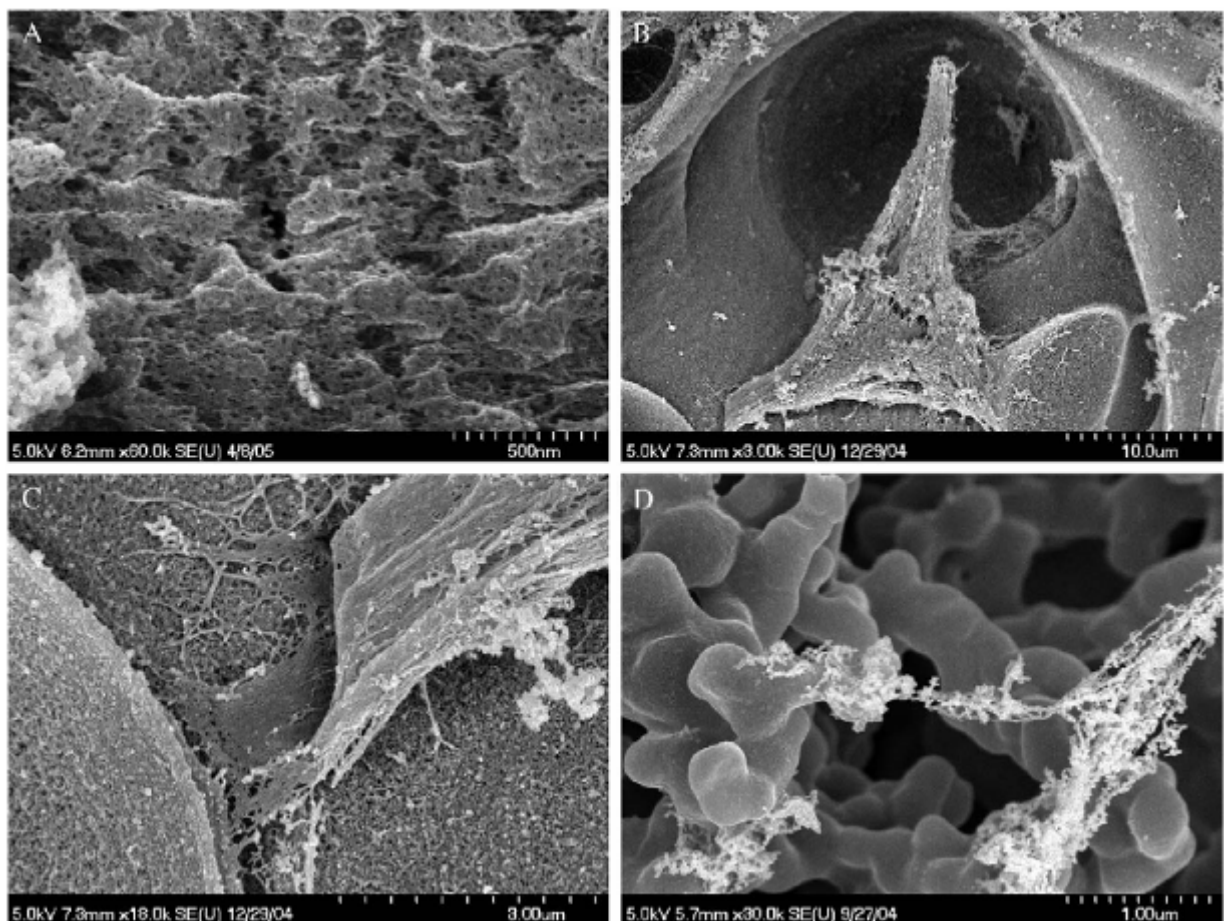


**Figura 2.20** – Processo de Bioimpressão

Boland utilizou recentemente uma impressora jacto de tinta da HP devidamente modificada, para a bioimpressão directa de células. Para tal, modificou a impressora, que passou a incluir uma plataforma móvel e os tinteiros foram substituídos por um tinteiro contendo um material polimérico e células (Figura 2.21). As estruturas poliméricas criadas permitiram com sucesso a proliferação quer de células musculares cardíacas quer de células endoteliais (Figura 2.22).

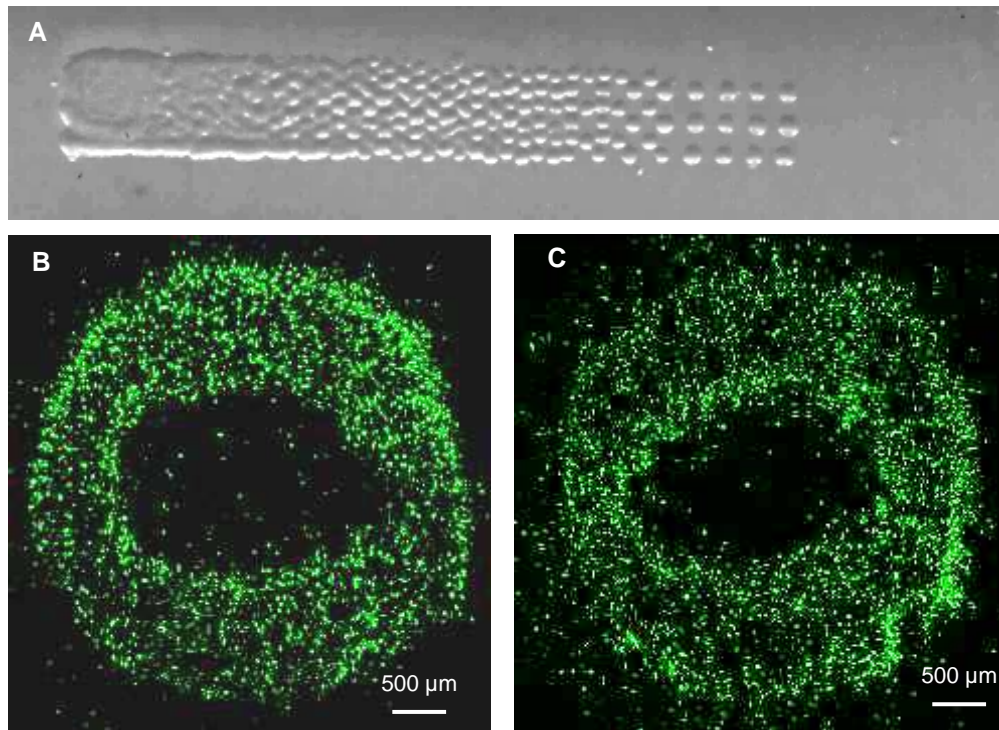


**Figura 2.21** – Processo de bioimpressão desenvolvido pelo grupo liderado por Boland (Varghese *et al*, 2005)



**Figura 2.22** - Células endoteliais em matriz de alginato produzidas por bioimpressão (Boland *et al*, 2006).

De forma semelhante Xu *et al* (2004, 2005) conseguiu bioimprimir células procrióticas e neuronais.



**Figura 2.23** – A) Bioimpressão células procrióticas, B) e C) - bioimpressão de células neuronais (Xu *et al*, 2004, 2005 )

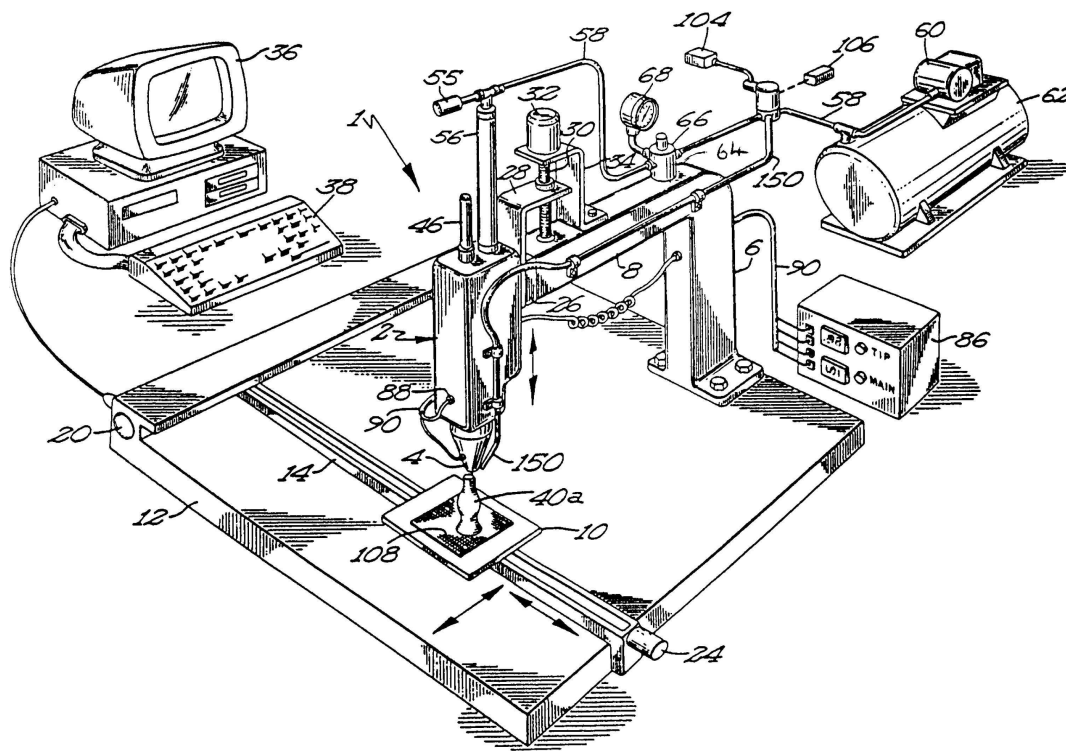
Na tabela 2.4 apresenta as principais vantagens e desvantagens da estratégia de biofabricação por impressão 3D.

**Tabela 2.4** – Vantagens e desvantagens do processo Inkjet Printing

| Vantagens                       | Desvantagens   |
|---------------------------------|--|
| -Baixos tempos de construção;   | - Pode requerer pós-processamento;                         |
| - Microporosidade induzida;     | - Baixas propriedades mecânicas do material de construção; |
| - Não são necessários suportes; | - Material aprisionado.                                    |
| - Água como ligante.            |  |

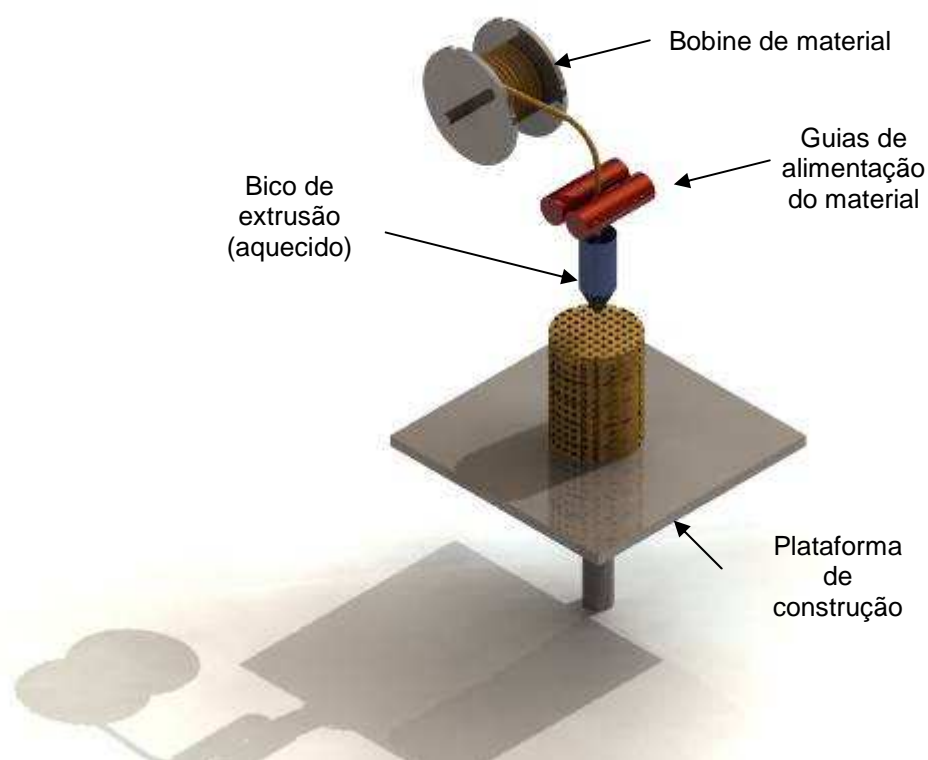
### 2.5.4 Extrusão

O processo de fabricação aditiva por extrusão (Figura 2.24) foi desenvolvido por Scott Crump sob designação de *Fused Deposition Modelling* (FDM) (Crump, 1990). Este processo (Figura 2.25) baseia-se na extrusão de um material termoplástico através de uma pequena fieira. O material sob a forma de fio é alimentado através de uma bobine. Uma cabeça de extrusão varre a área requerida para depositar o material de modo homogéneo em cada camada, o qual vai solidificando durante o arrefecimento. Quando a camada se encontra completamente preenchida a plataforma que suporta o objecto em construção é ajustada em altura e o ciclo de extrusão para deposição de uma nova camada é iniciado. A existência de uma bolsa de ar entre a cabeça extrusora e a plataforma de construção, impede o contacto entre ambas, reduzindo o atrito e permitindo elevadas velocidades de extrusão. Em aplicações no domínio da engenharia são utilizadas ceras, ABS e poliamidas permitindo a obtenção de protótipos funcionais.



**Figura 2.24** – Processo FDM proposto por Crump (Crump, 1990)





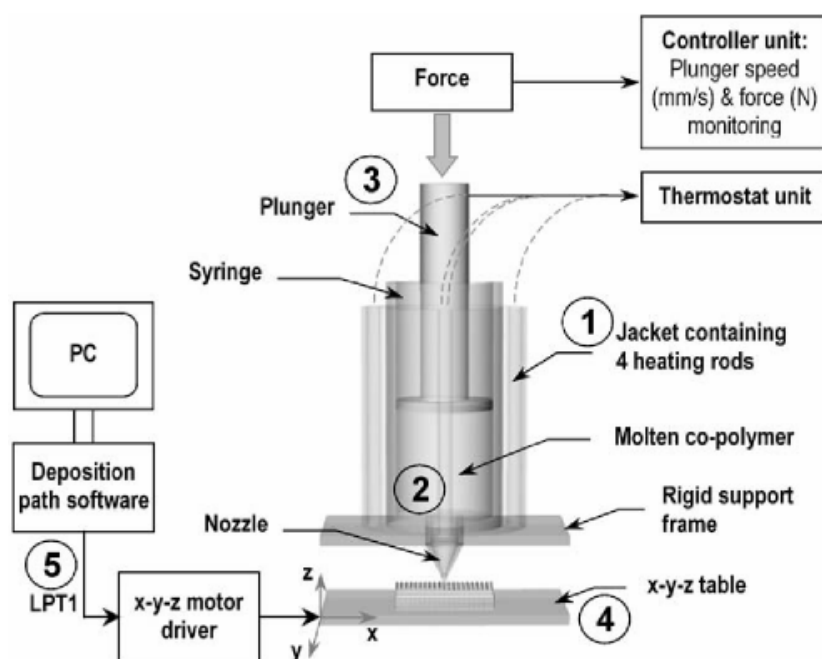
**Figura 2.25** - Princípio de funcionamento de um sistema de extrusão para produção de *scaffolds*

Em engenharia de tecidos os materiais mais utilizados são a policaprolactona, misturas de polipropileno/tricálcio fosfato, policaprolactona/hidroxiapatite e policaprolactona/tricálcio de fosfato (Bártolo *et al*, 2007). Trata-se de uma técnica que permite a obtenção de matrizes de suporte com elevadas propriedades mecânicas mas que apresenta algumas limitações importantes nomeadamente, a necessidade de temperaturas de processamento que em alguns casos podem ser significativas, janelas de processamento muito apertadas e a necessidade do material ser fornecido sob a forma de fio.

Não obstante as limitações apresentadas, Hutmacher *et al* (2001) optimizou os parâmetros de processamento em FDM para a produção de *scaffolds* com uma estrutura do tipo favo de abelha em policaprolactona. A resposta *in vitro* por parte de células do tipo fibroblastos e osteoblastos foi igualmente investigada. Um trabalho semelhante foi conduzido por Zein *et al* (2002) que produziram *scaffolds* em PCL com poros de dimensão entre 160 e 700  $\mu\text{m}$ , filamentos com diâmetro entre 260 e 370  $\mu\text{m}$  e porosidades entre 48 e

77 %. Testes mecânicos realizados sobre estes *scaffolds* mostraram uma resistência à compressão entre 4 e 77 MPa e tensões de cedência entre 0.4 e 3.6 MPa.

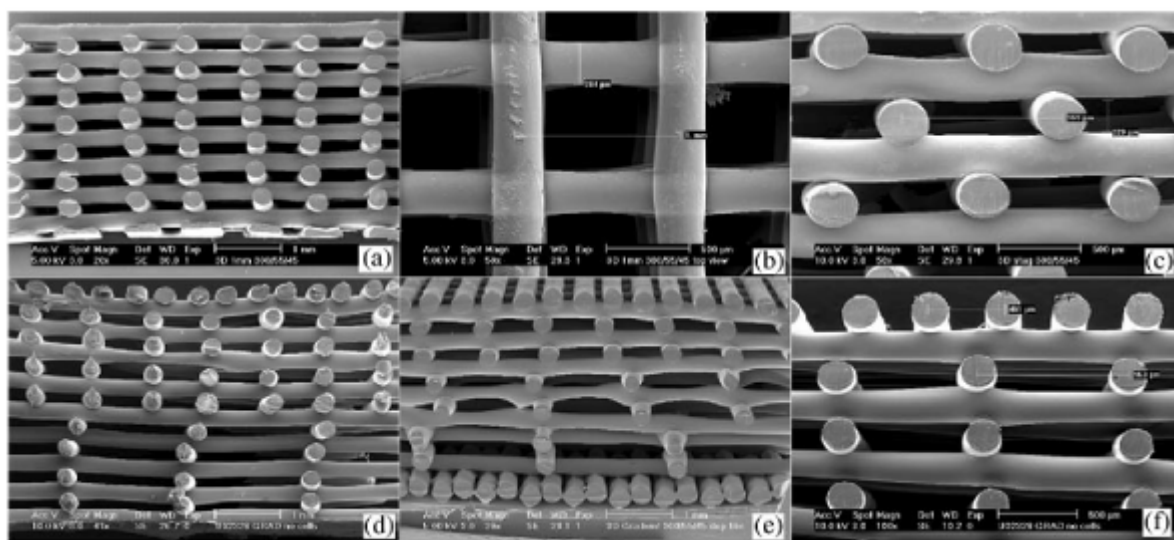
Woodfield (Woodfield *et al*, 2004) desenvolveu uma estratégia semelhante ao processo FDM designada por 3D *Fiber Deposition* para a produção de *scaffolds* em Polietileno glicol teraftalato (PEGT) e polibutileno teraftalato (PBT). Este sistema (Figura 2.26) é constituído uma zona de aquecimento e fusão do material e um depósito de material constituído por um seringa e um bico de extrusão. Para que o material seja extrudido de forma controlada é aplicado num êmbolo uma força que promove a extrusão deste, sob uma mesa de construção x-y.



**Figura 2.26** – Sistema de deposição de fibras desenvolvido por Woodfield et al. (2004)

A camisa em aço inoxidável que envolve a seringa contém cinco resistências de aquecimento controladas por termóstato permitindo uma gama de temperaturas de 0°C a 350°C. No interior desta seringa são colocados os pequenos grãos de polímero em atmosfera inerte com recurso a gás (nitrogénio) e depois fundidos. É então aplicada uma pressão para promover a extrusão do polímero fundido recorrendo a um êmbolo em aço inoxidável com vedante em

Teflon. A pressão foi controlada colocando todo o sistema de deposição numa máquina universal de ensaios mecânicos (Hounsfield HTE) de forma a controlar a posição do êmbolo e monitorizar a força necessária para promover a extrusão, recorrendo-se a uma célula de carga de 20 KN. Através deste controlo com elevada precisão foram obtidos os parâmetros necessários para obter um caudal óptimo adequado aos bicos desenvolvidos. O controlo da posição e da velocidade da mesa de construção é feito através de motores de passo activados por impulsos enviados a partir de um programa desenvolvido em Visual Basic através da porta LPT1 do computador que controla o sistema. Os dados de entrada no programa incluem parâmetros como a dimensão do *scaffold*, o espaçamento entre as deposições de filamentos, o número de camadas e velocidades. *Scaffolds* com configurações variadas e possuindo uma elevada interconectividade entre poros foram assim obtidos (Figura 2.27).

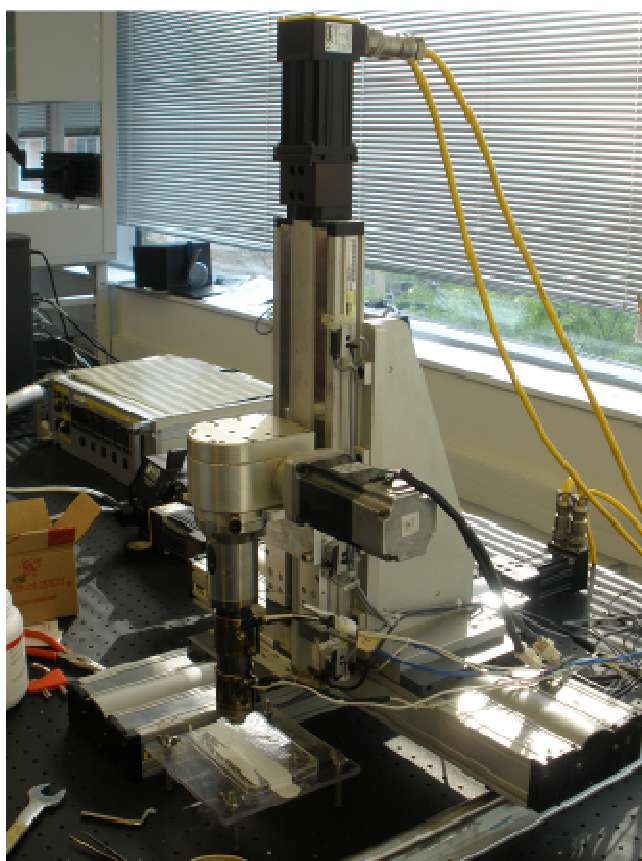


**Figura 2.27** – *Scaffolds* produzidos por 3D Fiber Deposition (Woodfield *et al*, 2004)

Como forma de evitar a necessidade de se utilizar material sob a forma de fio, um grupo de investigadores da Universidade de Drexel nos EUA, liderado pelo professor Wei Sun desenvolveu uma variante do processo FDM designada por *Precision Extruding Deposition* (PED), indicado na Figura 2.28. Este sistema funciona com material granular depositado numa câmara aquecida. Em seguida, o sistema de extrusão deposita o material fundido através de um bico de deposição.



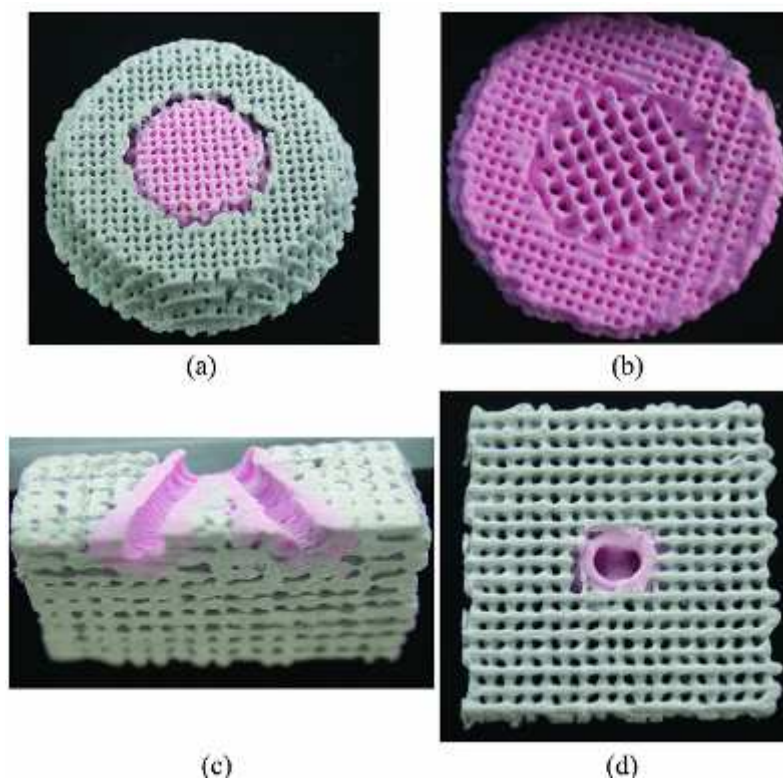
Para se obter uma deposição precisa o sistema de posicionamento e o dispositivo de extrusão têm que estar devidamente sincronizados. Este sistema desenvolvido para aplicações ósseas utiliza como material a policaprolactona. O processo foi usado por Wang et al (2004) para a produção de scaffolds com poros de 250  $\mu\text{m}$  e filamentos depositados com orientações 0/90°, 0/120° ou combinações 0/120 e 0/90°. Foram igualmente realizados estudos de proliferação celular.



**Figura 2.28** - Sistema *Precision Extruding Deposition*

De forma semelhante Xiong et al (2001, 2005) desenvolveram o conceito de *Precise Extrusion Manufacturing* (PAM) para produção de scaffolds em PLA com poros de dimensão entre 200 e 500  $\mu\text{m}$  destinados a aplicações ósseas. No processo, que permite processar teoricamente qualquer biopolímero termoplástico, o material é colocado num cilindro aquecido com 6 mm de diâmetro e 80 mm de comprimento, extrudido através de um bico com cerca de 0.3 mm de diâmetro por acção de ar comprimido.

De modo a eliminar-se o problema da necessidade de elevadas temperaturas que caracterizam os processos de extrusão, investigadores da Universidade de Tsinghua na China, desenvolveram um processo designado por *Low Temperature Deposition Manufacturing* (LDM) para produzir *scaffolds* a temperaturas da ordem dos 0°C, bem como uma variante designada por M-LDM - *Multi-Nozzle Low Temperature Deposition and Manufacturing* (Li e Zhuo, 2008). O sistema M-LDM, semelhante ao LDM mas possuindo um número de bicos de deposição superior, compreende uma fase de preparação do material, um sistema de vários bicos de extrusão para deposição a baixa temperatura e uma etapa de liofilização (Li e Zhuo, 2008). No sentido de ser possível a fabricação de *scaffolds* multi-material foi desenvolvido um software apropriado. Diferentes tipos de bicos de deposição foram igualmente considerados dependendo do material a processar: bicos de extrusão pneumáticos, bicos de extrusão piezoeléctricos, bicos de extrusão actuados por solenóide e bicos de extrusão actuados por volume injectado. Na Figura 2.29 apresentam-se alguns *scaffolds* obtidos por M-LDM



**Figura 2.29** - *Scaffolds* obtidos pelo sistema M-LDM (Li e Zhuo, 2008)

De forma semelhante, Khalil (Khalil *et al*, 2005) desenvolveu um sistema designado por *Multi-Nozzle Deposition* destinado à produção de *scaffolds* em hidrogel (Figura 2.30). Este processo opera à temperatura ambiente e a baixas pressões permitindo, por exemplo, a deposição de materiais poliméricos de baixa viscosidade do tipo hidrogel e o encapsulando células.

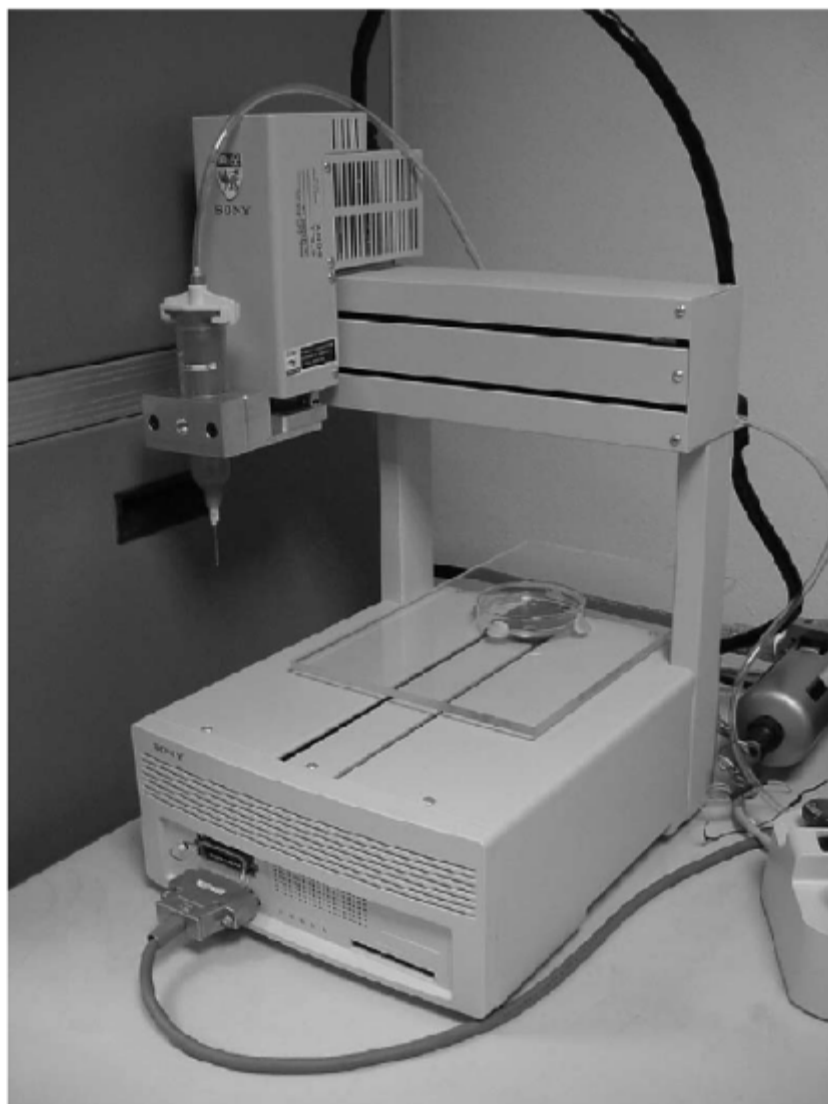


**Figura 2.30** - Sistema designado por *Multi-Nozzle Deposition* desenvolvido por Khalil

Um processo alternativo designado por *Pressure Assisted Microsyringe (PAM)* foi recentemente desenvolvido na Universidade de Pisa (Vozzi *et al* , 2003). Este processo envolve a deposição de polímero dissolvido em solvente através de uma seringa. A espessura do filamento depositado depende da pressão aplicada à seringa, da viscosidade da solução, do diâmetro da seringa e da velocidade. Com esta técnica obtiveram-se estruturas de elevada resolução (resoluções inferiores a 10  $\mu\text{m}$  em estruturas bidimensionais)

O processo Robocasting consiste na deposição de suspensões coloidais concentradas capazes de suportarem o seu próprio peso durante o processo de

construção devido às suas propriedades viscoelásticas (Miranda *et al*, 2006). Esta estratégia envolve um dispositivo robotizado de deposição e foi utilizado para a produção de *scaffolds* biocerâmicos (Saiz *et al*, 2007; Miranda *et al*, 2006). Ang (Ang *et al*, 2002) desenvolveu um processo de construção semelhante designado por *Robotic Dispensing* para a produção de *scaffolds* em quitosano e hidroxiapatite (Figura 2.31). Neste caso soluções de quitosano e hoidroxiapatite são extrudadas para uma plataforma de trabalho que contém um meio líquido de etanol e hidróxido de sódio no qual ocorre a precipitação do quitosano. Os *scaffolds* uma vez produzidos são hidratados, congelados e liofilizados.



**Figura 2.31** – Sistema de *Robotic Dispensing* (Hutmacher *et al*, 2007)

Na tabela 2.5 apresentam-se as principais vantagens e desvantagens do processo FDM.

**Tabela 2.5** - Vantagens e desvantagens do processo FDM

| Vantagens                                      | Desvantagens  |
|--|---|
| - Grande diversidade de materiais admissíveis; | - Necessita de suportes estruturais;                |
| - Ausência de <i>laser</i> ;                   | - Temperaturas de processamento por vezes elevadas; |
| - Boas propriedades mecânicas.                 | - Janela de processamento apertada;                 |
|  | - Material sob a forma de fio.                      |

## 2.6 Conclusões

As técnicas aditivas desenvolvidas nos anos 1980 para a produção de modelos conceptuais e designadas na altura como técnicas de prototipagem rápida tem vindo a ganhar, nos últimos anos, grande relevância pelo potencial tecnológico que encerram. Nos anos 1990 as tecnologias de prototipagem rápida evoluíram no sentido do fabrico rápido de ferramentas de produção (*rapid tooling*) e posteriormente no sentido do fabrico directo de componentes (*rapid manufacturing*). No início deste século, verificou-se que estas tecnologias têm um enorme potencial para aplicações em engenharia de tecidos, oferecendo neste caso um elevado grau de liberdade no que diz respeito ao projecto de *scaffolds* (dimensão do poro, geometria do poro, interconectividade, etc.) ou na sua fabricação. Várias são as tecnologias aditivas de biofabricação actualmente existentes e que foram descritas com detalhe neste capítulo. Estas tecnologias permitem a produção de *scaffolds* numa gama alargada de materiais biopoliméricos, biocerâmicos e compósitos para aplicações quer em tecidos duros quer em tecidos moles. Independentemente das diferentes tecnologias o fluxo de

informação é comum a todas elas tal como foi descrito neste capítulo. De modo semelhante ao que acontece no domínio industrial, também ao nível da engenharia de tecidos não existem técnicas ideais, apresentando todas elas vantagens e desvantagens, tal como se indica na Tabela 2.6.

Este é um domínio de intensa investigação, pretendendo-se o desenvolvimento de sistemas que permitam a produção de *scaffolds* biomiméticos, de *scaffolds* inteligentes e de *scaffolds* concebidos para aplicações biomecânicas complexas, envolvendo a combinação de múltiplos materiais, condições de processamento amenas e a impressão directa de células, no que constituirá a antecâmara da bioimpressão de órgãos projectada para o futuro. De entre as tecnologias existentes, os processos baseados na extrusão são aqueles que maior actividade de investigação tem registado. Trata-se de uma tecnologia que permite a utilização de uma gama bastante alargada de materiais e que nas suas múltiplas variantes apresenta uma janela de processamento mais alargada. Contudo, o desenvolvimento de sistemas baseados no processo de extrusão capazes de, de forma hierarquizada depositarem materiais com características mecânicas muito diversas, induzindo desta forma respostas celulares também diferentes e orientadas, constitui uma forte necessidade. Para além destas características, estes sistemas deverão possuir capacidades de, usando princípios híbridos de extrusão e impressão, bioimprimirem igualmente células. É neste sentido que este trabalho de investigação se insere ao pretender constituir a base de um sistema de fabrico multi-material utilizando os princípios híbridos referidos anteriormente para bioimpressão de células, de materiais para aplicações em tecidos molde e aplicações em tecidos duros. O desenvolvimento conceptual e o protótipo da primeira versão deste sistema designado por Bioextruder são descritos de forma detalhada no capítulo 3. Testes realizados com policaprolactona, apenas para validação do processo de fabrico, são apresentados no capítulo 4, apresentando-se igualmente alguns estudos de citotoxicidade realizados com intuito de se averiguar a adequabilidade do material utilizado para a construção de *scaffolds* para a engenharia de tecidos.

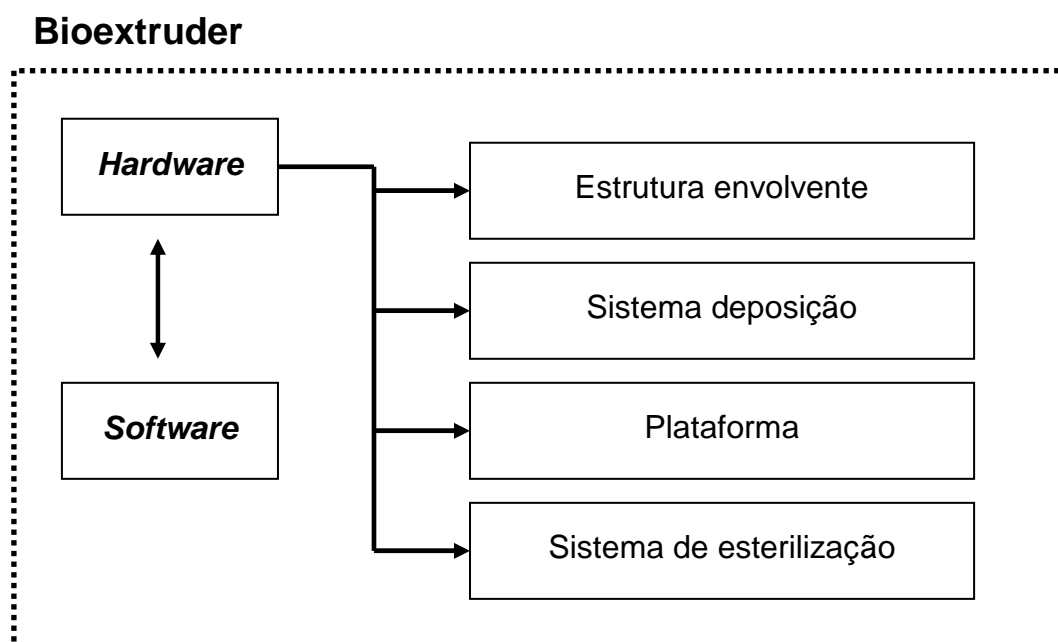
**Tabela 2.6 - Vantagens e desvantagens dos processos aditivos**

|                          | <b>Vantagens</b>   | <b>Desvantagens</b>  | <b>Materiais</b>                          | <b>Resolução</b>  |
|--------------------------|--|--|---|-------------------|
| <b>Sinterização</b>      | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Não necessita de suportes estruturais;</li> <li>- Grande diversidade de materiais;</li> <li>- Peças de elevada resistência mecânica e térmica;</li> <li>- Definição rápida das camadas;</li> <li>- Elevada porosidade (microporosidade).</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Elevadas temperaturas de processamento;</li> <li>- Material aprisionado;</li> <li>- Ciclos de aquecimento e arrefecimento da câmara elevados;</li> <li>- Distorções e empenos;</li> <li>- Consumo de energia elevado durante a sinterização;</li> </ul> | PEEK-HA, PCL, HA                          | 500 $\mu\text{m}$ |
| <b>Estereolitografia</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Possibilidade de obtenção de modelos de geometrias complexas;</li> <li>- Boa precisão dimensional;</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Necessidade de pós-cura;</li> <li>- Necessita de suportes estruturais;</li> <li>- Contrações e empenos dos modelos obtidos;</li> <li>- Utilização de lasers.</li> </ul>   | HA, agarose, dextrano, polietileno-glicol | 250 $\mu\text{m}$ |
| <b>Inkjet printing</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Baixos tempos de construção;</li> <li>- Microporosidade induzida;</li> <li>- Não são necessários suportes;</li> <li>- Água como ligante.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pode requerer pos-processamento;</li> <li>- Baixas propriedades mecânicas do material de construção;</li> <li>- Material aprisionado.</li> </ul>  | PLLA, PLGA, Amido PCL PCL/HA PCL/TCP      | 300 $\mu\text{m}$ |
| <b>Extrusão</b>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Grande diversidade de materiais admissíveis;</li> <li>- Ausência de laser;</li> <li>- Boas propriedades mecânicas.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Necessita de suportes estruturais;</li> <li>- Temperaturas de processamento por vezes elevadas;</li> <li>- Janela de processamento apertada;</li> <li>- Material sob a forma de fio.</li> </ul>   | PCL, PP-TCP, PCL-HA, PCL-TCP              | 250 $\mu\text{m}$ |

## Capítulo 3 – Sistema Bioextruder

### 3.1 Introdução

Este capítulo descreve o trabalho de desenvolvimento do sistema de bioextrusão. Este trabalho consistiu em desenvolvimentos ao nível do hardware e software de controlo. Ao nível do hardware foram considerados quatro componentes: estrutura envolvente, sistema de deposição, plataforma e sistema de esterilização Figura 3.1.



**Figura 3.1** – Componentes considerados para o sistema de Bioextrusão

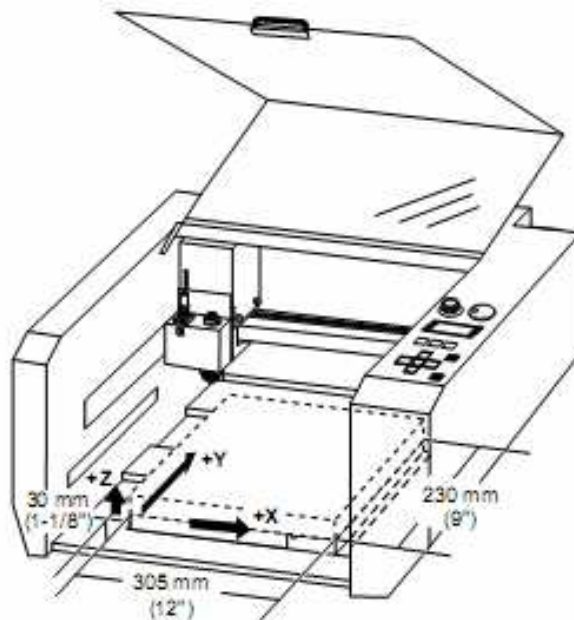
O sistema de Bioextruder foi concebido considerando-se as seguintes premissas:

- i) O sistema deve ter capacidade para processar materiais numa gama alargada de pressões e temperaturas. Deverá permitir a utilização de biopolímeros sintéticos e naturais, biocompósitos cerâmico/polímero, materiais de alta, média ou baixa viscosidade e a impressão directa de células;



- ii) Deverá possuir um sistema de esterilização;
- iii) Deverá permitir o fabrico de *scaffolds* com configurações diferentes, diferentes geometrias de poro e diferentes porosidades;
- iv) Deverá possuir por questões de rigor e simplicidade uma plataforma móvel em z e um sistema de deposição móvel no plano x-y.

O constrangimento existente para a definição do sistema resultou do facto de se ter optado por utilizar uma estrutura de um equipamento laboratorial de comando numérico (Roland CAMM2) oferecido pelo representante da Roland em Portugal. Este sistema condicionou a área de trabalho da Bioextruder uma vez que se optou por não se realizar qualquer alteração significativa ao nível estrutural do equipamento. As dimensões da área de trabalho são indicadas na Figura 3.2 e na Tabela 3.1 onde se apresentam também as características adicionais do equipamento base.



**Figura 3.2** – Equipamento base da Roland utilizado

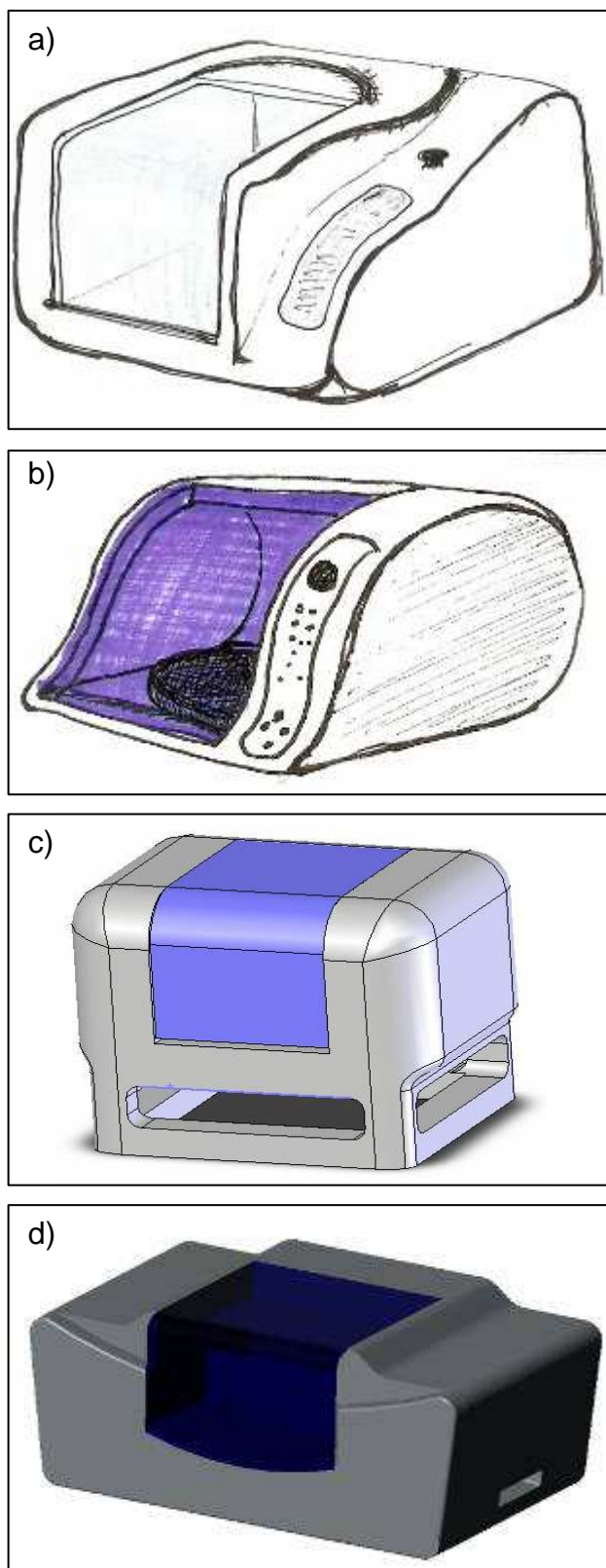
**Tabela 3.1** - Especificações do equipamento base (Roland CAMM PNC-2300)

| <b>Especificações (Roland CAMM PNC-2300)</b> |   |
|--|---|
| Área de trabalho                             | 305 mm (X) x 230 mm (Y) x 30 mm (Z)                 |
| Velocidades de avanço (máx.)                 | Eixo X e Y: 3600 mm/min.<br>Eixo Z: 1800 mm/min.    |
| Precisão mecânica                            | Eixo X e Y: 0.00125 mm/step<br>Eixo Z: 0.01 mm/step |
| Tensão                                       | 220—230 V   |
| Corrente                                     | 0.7 A   |
| Comunicação                                  | Porta LPT1  |

### 3.2 Hardware do sistema Bioextruder

#### 3.2.1 Estrutura envolvente

Por questões de funcionalidade procedeu-se à substituição parcial da estrutura exterior do equipamento base. Esta estrutura foi concebida para proteger o utilizador de todos os componentes mecânicos e eléctricos e assegurar o isolamento da zona de trabalho. Vários modelos para a estrutura envolvente foram nesta etapa considerados tal como se indica na Figura 3.3. Por questões de adaptabilidade à estrutura base existente e simplicidade de fabrico optou-se pelo conceito indicado na Figura 3.3 d)



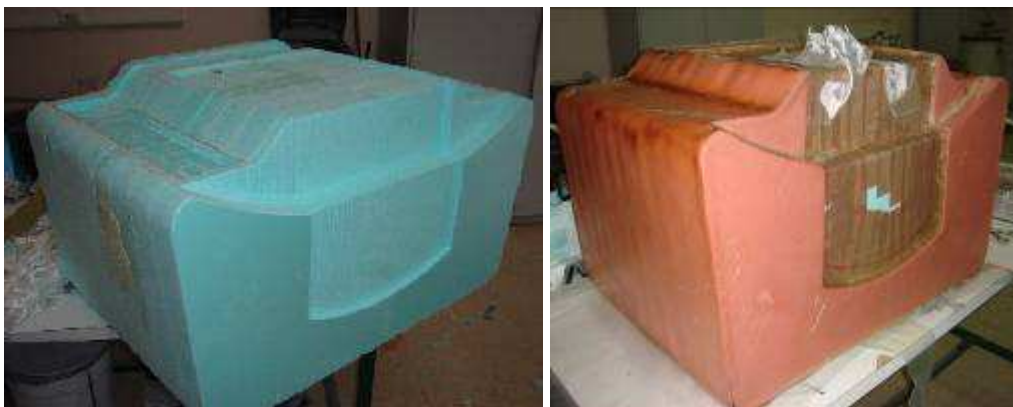
**Figura 3.3** – Diferentes conceitos para a estrutura envolvente do sistema Bioextruder a), b), c) Propostas apresentadas, d) design da estrutura exterior seleccionado.

Uma vez definido o conceito procedeu-se à criação do modelo CAD correspondente a partir do esboço em papel tendo-se para tal utilizado o software Rhinoceros. Esta passagem envolveu:

- Digitalização do esboço em papel;
- Criação de um ficheiro de imagem JPEG;
- Importação da imagem para software Rhinoceros;
- Criação de polilinhas;
- Criação do modelo 3D;

Uma vez obtido o CAD 3D procedeu-se à sua adaptação às dimensões da estrutura base procedendo-se em seguida à sua fabricação.

Por questões dimensionais optou-se por construir um modelo perdido em poliestireno extrudido para servir de base à moldação. Assim, foi possível obter uma estrutura compósita em fibra de vidro e resina de poliéster insaturado. O modelo (Figura 3.4) foi maquinado em diversas secções que foram coladas sequencialmente formando assim o molde final. Para tal elaborou-se previamente vários programas de maquinação utilizando-se o *software Modela Player 4*, tendo as maquinações sido realizadas no equipamento Roland MDX-650.



**Figura 3.4** – Molde em poliestireno extrudido produzido em camadas para obtenção da estrutura envolvente do sistema Bioextruder

Concluído o molde, foi necessário realizar um conjunto de etapas correspondentes ao processo de moldação em vácuo da estrutura compósita de fibra de vidro final. Estas etapas envolveram as seguintes operações:

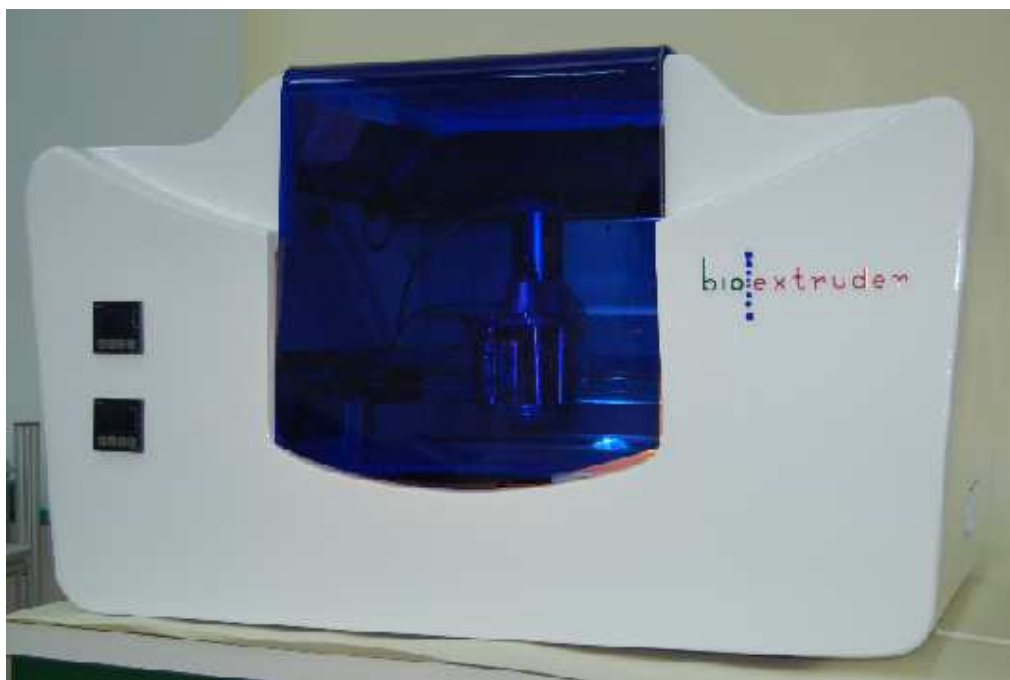
- Impermeabilização do modelo com fita-cola;
- Preparação de reforços estruturais (espuma de poliuretano);
- Aplicação de desmoldante (álcool polivinílico);
- Aplicação das camadas de fibra de vidro;
- Aplicação de poliéster insaturado;
- Preparação para vácuo (criação de saco de vácuo, aplicação de filme microperfurado, aplicação de tela de arrancamento, aplicação de tecido de absorção);
- Fecho do saco de vácuo e aplicação do vácuo.

Após a obtenção da estrutura em compósito procedeu-se a operações de acabamento e pintura. Para o acesso da zona de trabalho concebeu-se uma janela em acrílico, obtida a partir de uma placa de 5 mm de espessura conformada a quente que em seguida foi montada na estrutura anterior por meio de uma dobradiça (Figura 3.5).



**Figura 3.5** – Estrutura obtida em compósito.

Finalmente foi pensado num logótipo para o sistema, que posteriormente foi maquinado em acrílico e colado sobre a estrutura tal como se indica na Figura 3.6



**Figura 3.6** – Estrutura envolvente em compósito após aplicação no equipamento

### 3.2.2 Sistemas de extrusão

O sistema de extrusão constitui o elemento central do equipamento. Este, foi concebido para permitir a produção de *scaffolds* multi-material com a deposição organizada, permitindo diferentes tipos de trajectórias de deposição, diferentes dimensões de filamento, diferentes níveis de porosidade e diferentes arquitecturas de poro. O sistema de extrusão deverá ainda garantir a produção de *scaffolds* com poros totalmente interconectados. Para o cumprimento de tais requisitos, o sistema de extrusão deverá ser fiável, permitir o processamento de diferentes materiais com características igualmente diferentes e ser facilmente controlado por computador. O funcionamento do sistema de extrusão é controlado a partir do computador que controla todo o sistema Bioextruder e no qual o operador tem a possibilidade de controlar os seguintes parâmetros:

- Temperatura do(s) reservatório(s);

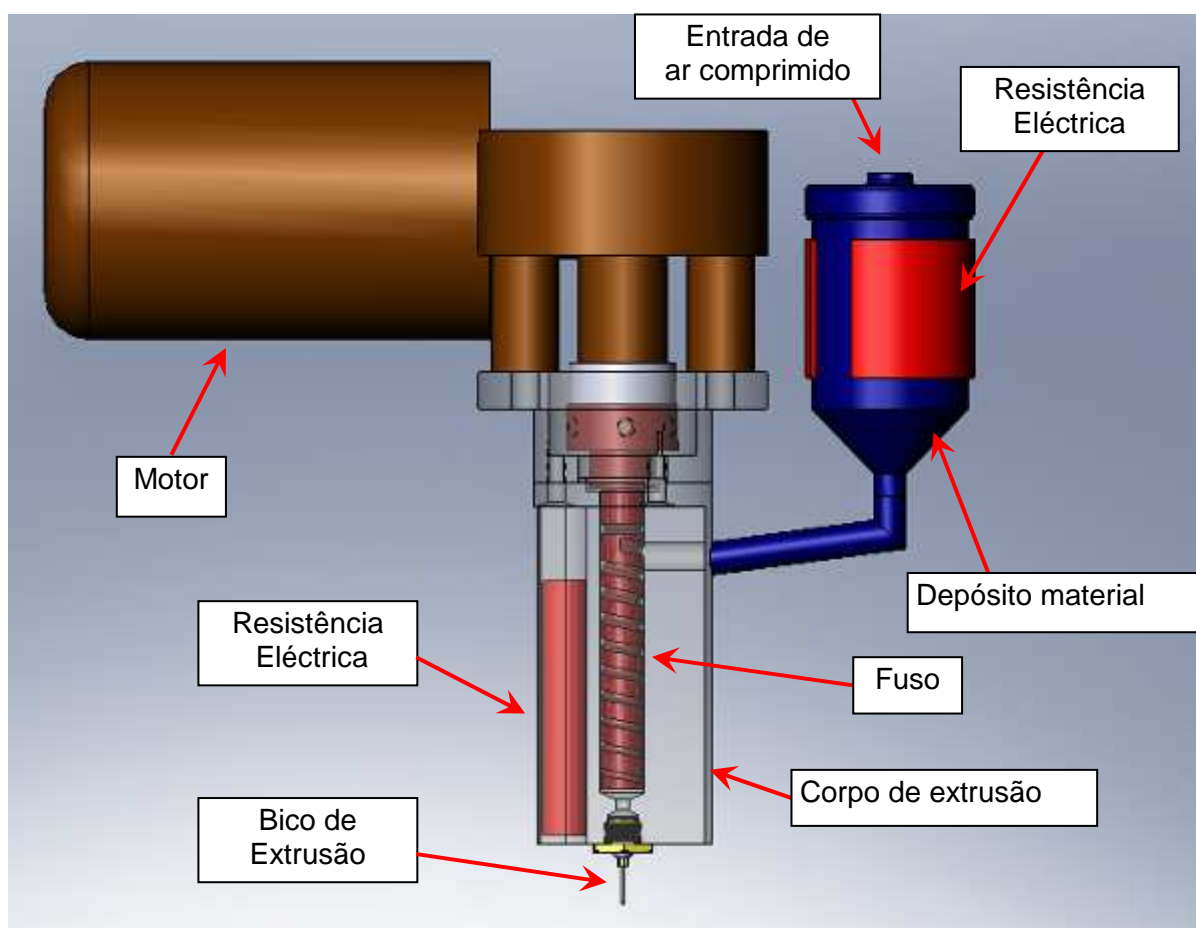
- A pressão no(s) reservatório(s);
- A velocidade de rotação do fuso (caso exista)
- A velocidade de deposição.

O sistema de extrusão está acoplado a uma braço metálico. O braço metálico desloca-se segundo o eixo do “y” do equipamento enquanto que, o sistema de extrusão se desloca ao longo do braço metálico (eixo do “x”). Deste modo, o conjunto braço/dispositivo de extrusão permite o varrimento de toda a área de trabalho. O accionamento, quer do braço, quer do dispositivo de extrusão, é efectuado por meio de dois motores de passo (Ref.: KP39FM2-044 da Japan Servo Co.Ltd).

O desenvolvimento do sistema de extrusão compreendeu duas fases. Numa primeira fase, para teste do sistema e para análise do controlo sobre o mesmo, foi considerado apenas um reservatório. Foi este sistema de extrusão, possuindo apenas um reservatório, que serviu para a obtenção dos *scaffolds* apresentado no capítulo 4 (Figura 3.7). Numa segunda fase, procedeu-se ao desenvolvimento de uma estrutura em revolver possuindo quatro reservatórios, dois dos quais aquecidos por resistências eléctricas (Figura 3.8). Este segundo sistema de extrusão foi produzido mas não testado experimentalmente.

O sistema de extrusão de um só reservatório consiste num depósito de material em alumínio revestido por uma resistência eléctrica que por acção de ar comprimido permite a passagem do material para um fuso igualmente aquecido por resistência eléctrica. Na base do corpo de extrusão, no qual está inserido o fuso situa-se o bico de extrusão que pode ser facilmente substituído dependendo das dimensões do filamento pretendidas. O fuso em aço inoxidável possui um comprimento de 50 mm, diâmetro de 10 mm e passo 7 mm, sendo accionado por um motor DC *Bosch*. A velocidade de rotação máxima do fuso é de 90 r.p.m. Os bicos de extrusão em aço inoxidável são bicos de seringa (Ref. 561126 da Silgal) e as suas dimensões variam entre 0.2 a 1 mm. O sistema de fixação dos bicos ao corpo de extrusão é feito por um adaptador roscado. O motor de accionamento do fuso é controlado por uma placa que permite a regulação de diversos parâmetros, nomeadamente a geração de rampa de arranque/paragem e permite ainda a

regulação da rotação do motor fazendo variar a tensão. O sistema de controlo de temperatura das diversas zonas de extrusão dispõe de um controlador PID por cada zona, permitindo assim uma estabilização da temperatura programada mais rapidamente bem como a garantia de um processo estável. Desta forma, o tempo de “arranque” do equipamento é reduzido, permitindo ainda o controlo quer da temperatura da zona de deposição quer do próprio sistema de deposição. O sistema de controlo de temperatura é composto por duas zonas de aquecimento independentes, podendo no entanto, fazer-se o controlo de diversas zonas ligadas em paralelo. Os principais componentes do sistema de controlo são indicados na Tabela 3.2

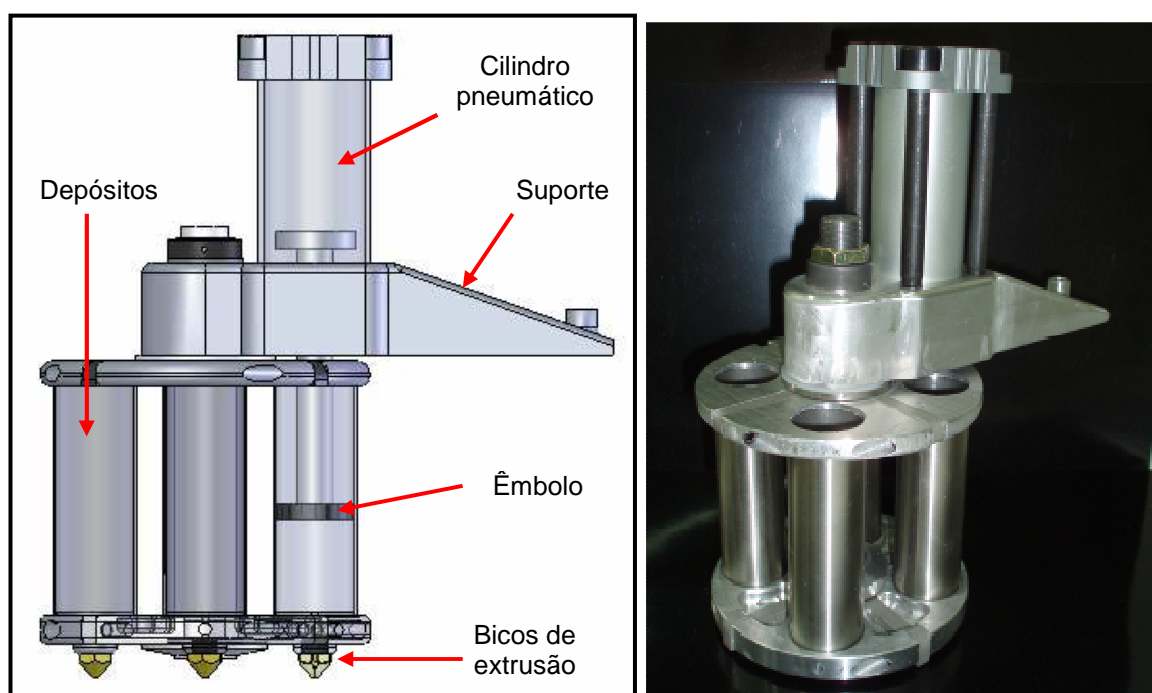


**Figura 3.7** – Sistema de extrusão contendo um reservatório



**Tabela 3.2** – Componentes principais do sistema de controlo de temperatura

| Sistema de controlo de temperatura |                                 |
|------------------------------------|---------------------------------|
| Controladores de temperatura       | P.I.D. Omron E5CN               |
| Resistências                       | Tubulares de 250W               |
| Controlo de sobreaquecimento       | Ventilador 220 VAC 120x120x25mm |

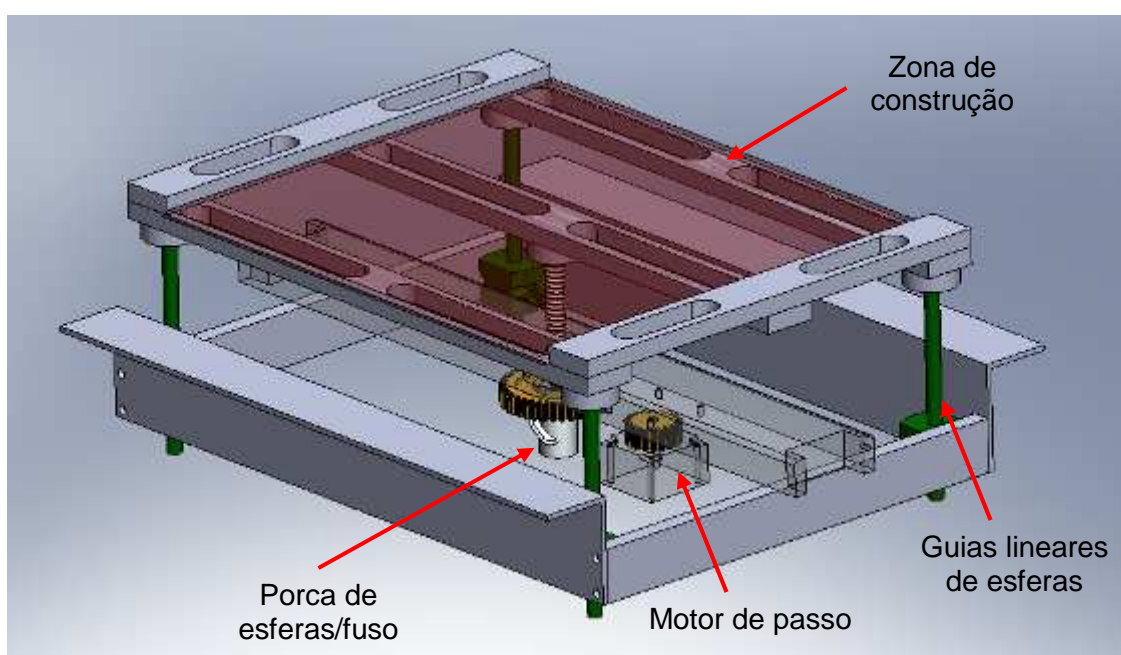


**Figura 3.8** – a) Modelo CAD do sistema multi-material e b) modelo físico do sistema multi-material

### 3.2.3 Plataforma

Como o equipamento de base utilizado possuía o sistema de movimentação do eixo do “z” no *spindle*, foi necessário proceder-se a uma alteração do equipamento, transferindo-se este movimento da cabeça da máquina inicial para a plataforma de construção do novo equipamento. Esta opção foi tomada de forma a garantir uma maior estabilidade ao processo de deposição. Para tal, foi projectada uma plataforma (Figura 3.9), accionada por um motor de passo (Ref.:

KP39FM2-044 da Japan Servo Co.Ltd). O movimento da plataforma em “z” faz-se através de quatro guias lineares de esferas que estão colocadas das extremidades da mesma. O valor deste movimento é controlado automaticamente a partir do valor especificado para o fabrico de um dado *scaffold*, e é igual ao diâmetro do filamento. A plataforma foi obtida por maquinação e o material utilizado foi o alumínio. A zona de construção que se insere sobre a plataforma é em acrílico. A movimentação é feita com a actuação do motor de passo, transmitindo o movimento a um conjunto porca de esferas/fuso.



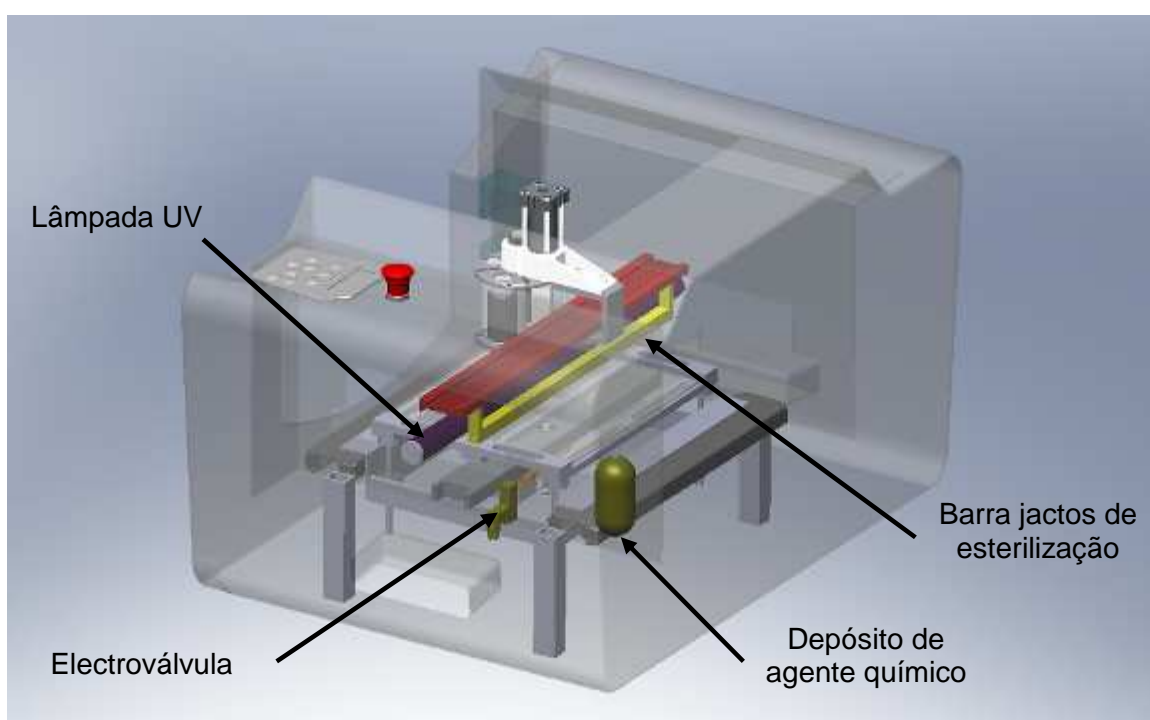
**Figura 3.9** – Plataforma de construção do equipamento Bioextruder

### 3.2.4 Sistema de Esterilização

Uma vez que o sistema Bioextruder foi concebido para aplicações destinadas a engenharia de tecidos foi necessário prever-se a existência de um sistema de esterilização. Para tal forma concebidos dois mecanismos:

- Esterilização por acção de uma lâmpada ultravioleta;
- Esterilização por *spray* de agente químico.

Para o primeiro caso, foi considerado uma lâmpada de ultravioletas posicionada na parte inferior do braço metálico de suporte do dispositivo de extrusão. No segundo caso, foi considerado um conjunto de jactos posicionados na parede lateral do braço metálico oposta à zona de colocação do dispositivo de extrusão. Estes jactos de esterilização são alimentados por um reservatório pressurizado permitindo assim a aplicação a alta pressão e com uma frequência elevada controlada por uma electroválvula. O sistema de esterilização encontra-se ilustrado na Figura 3.10

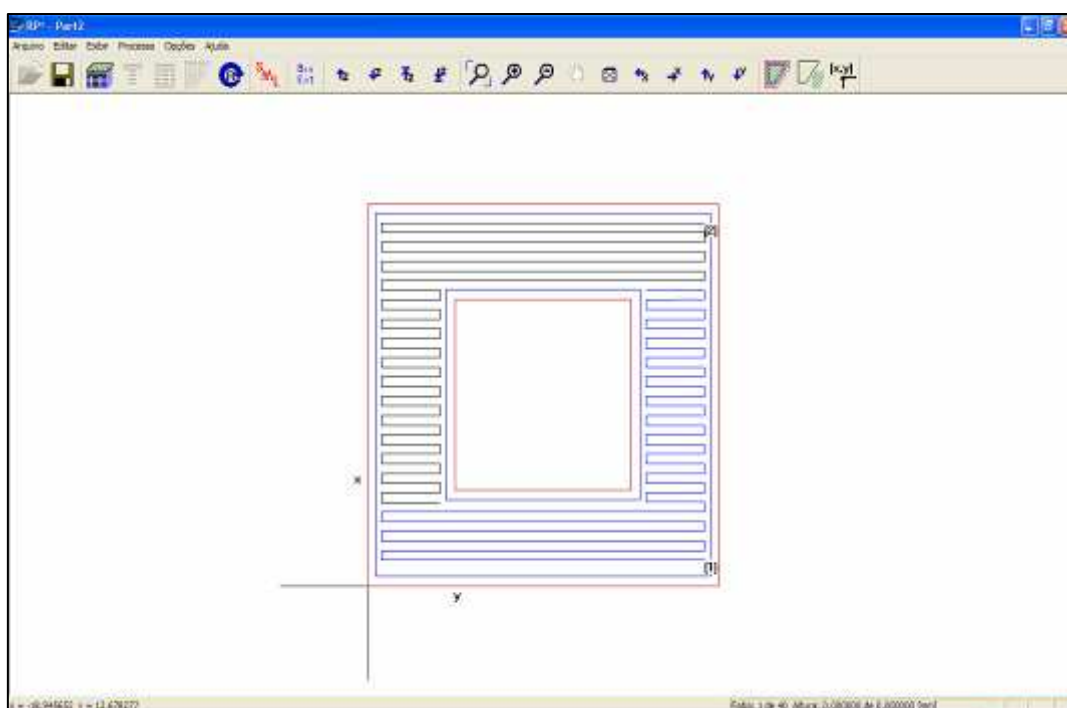


**Figura 3.10** – Sistema de esterilização

### 3.2.5 Software

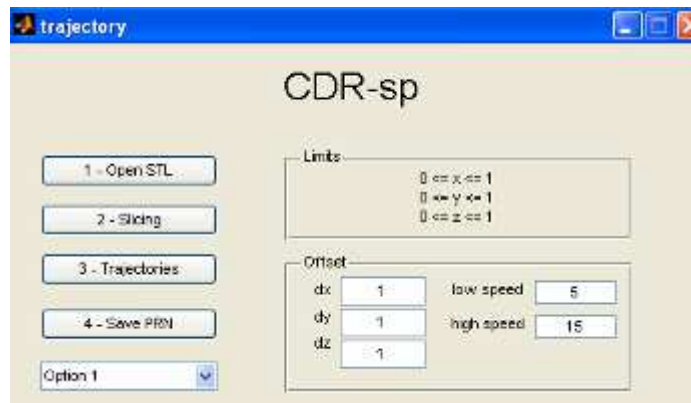
Tal como foi descrito anteriormente, o sistema Bioextruder foi construído utilizando por base um equipamento de base da Roland. Este equipamento possuía um software próprio de maquinação subtractiva, não compatível com a presente aplicação. Para tal e em colaboração com o Núcleo de Prototipagem e Ferramental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Brasil, adaptou-se

ao sistema Bioextruder o software RP<sup>3</sup> – *Rapid Prototyping Process Planning* (Figura 3.11). Este software, ainda em fase de desenvolvimento foi desenvolvido de forma específica para sistemas de extrusão e permite a introdução de diversos parâmetros de entrada, nomeadamente a possibilidade de definir a contracção do material e permitir ainda a alteração dos ângulos do varrimento, entre outros. No entanto apresenta algumas limitações de acordo com o tamanho e complexidade dos ficheiros STL a processar.



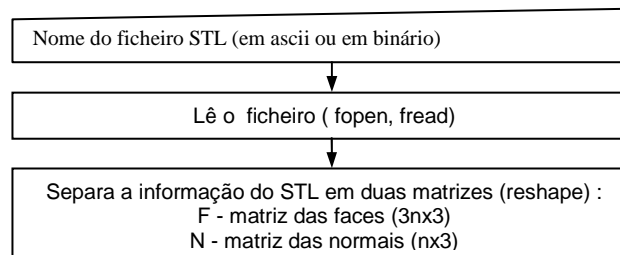
**Figura 3.11** – Software RP<sup>3</sup> adaptado para o sistema Bioextruder

De modo a contornar-se este problema foi desenvolvido uma aplicação específica em Matlab para leitura e processamento de ficheiros STL para o sistema Bioextruder. Esta aplicação, possui um interface onde o utilizador pode executar diversas operações (Figura 3.12), entre as quais a abertura do ficheiro STL, a operação de fatiamento, o cálculo das trajectória e a criação do ficheiro de processamento. É ainda possível definir alguns parâmetros referentes à deposição, nomeadamente o incremento em “x”, “y”, e “z” bem como as velocidades de varrimento.



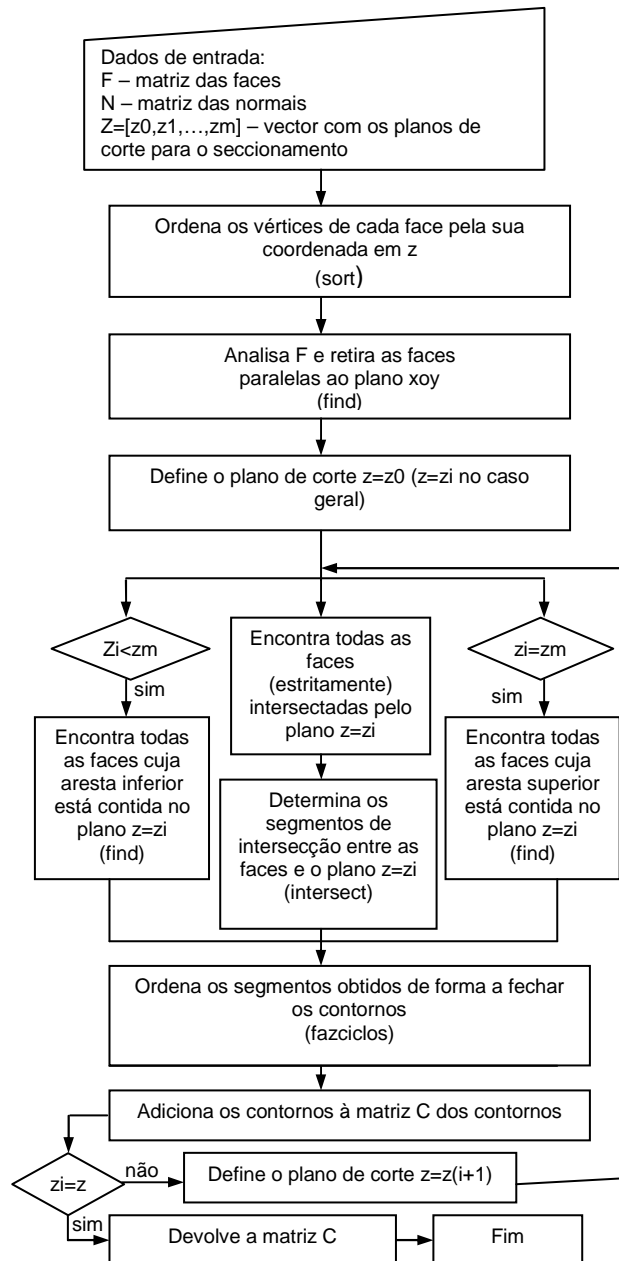
**Figura 3.12** – Interface do algoritmo criado em Matlab

O algoritmo desenvolvido compreende três módulos fundamentais: a leitura de dados a partir um ficheiro STL (binários ou ASCII), o seccionamento e finalmente o pós-processamento para o equipamento Bioextruder. Foram desenvolvidas duas funções de Matlab, `readstl` e `slicestl`, para a leitura do ficheiro STL e para o fatiamento do mesmo. A função `readstl.m` lê o ficheiro STL (em formato binário ou ascii) e devolve uma matriz,  $F$ , de dimensão  $3n \times 3$  com as  $n$  faces da triangulação, e uma matriz,  $N$ , de dimensão  $n \times 3$  com as normais exteriores de cada face da triangulação (Figura 3.13).



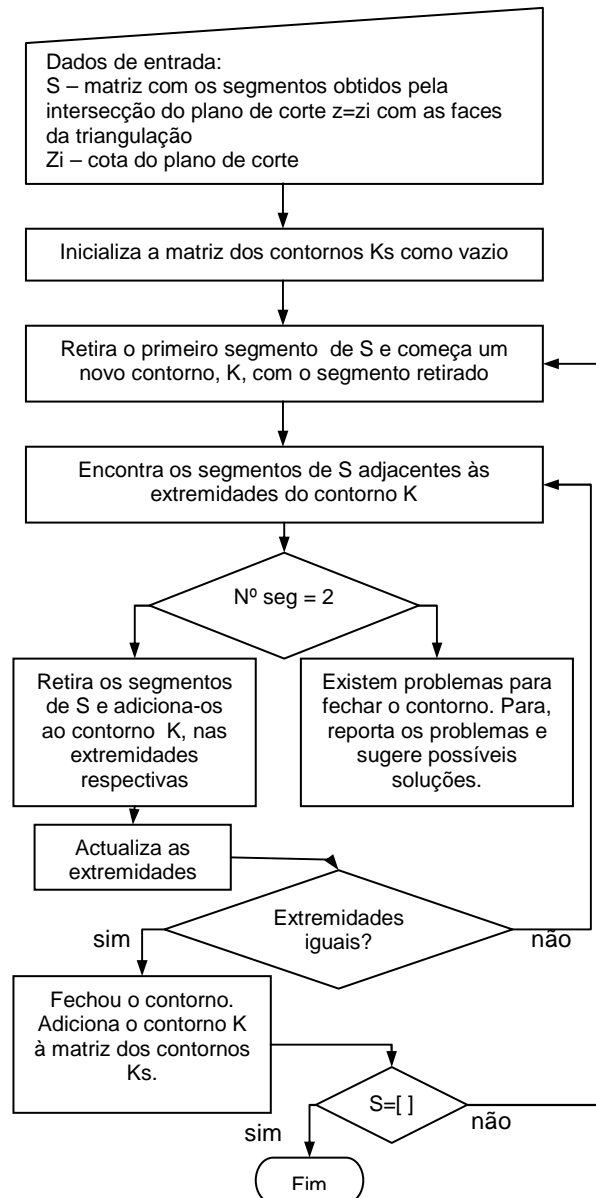
**Figura 3.13** - Fluxograma para `readstl.m`.

Utilizando as funções internas do MATLAB `fopen` e `fread` consegue-se um processo bastante rápido para ler, separar e carregar na memória toda a estrutura de um ficheiro STL, executando apenas uma única instrução.



**Figura 3.14** - Fluxograma para slicestl.m.

A função slicestl (Figura 3.14) recebe como parâmetros de entrada, duas matrizes (F e N) e um vector Z. A matriz F tem dimensão 3n x 3 (onde n é o número de faces da triangulação) sendo que as três primeiras linhas representam a primeira face, as três linhas seguintes representam a segunda face e assim sucessivamente.



**Figura 3.15** - Fluxograma da função fazciclos.

A matriz  $N$  tem dimensão  $n \times 3$  onde a linha  $i$  representa a normal exterior da face  $i$  tal como é obtida pelo ficheiro STL. O vector  $Z=[z_0, z_1, \dots, z_i, \dots, z_m]$  contém os valores de cada plano de corte do seccionamento (Estes valores são introduzidos pelo utilizador, logo também é possível adoptar uma estratégia de seccionamento adaptativo). Numa primeira fase do algoritmo, ordenam-se os vértices de cada face por forma a que a face  $F_i$  (constituída por uma matriz  $3 \times 3$  onde cada linha representa um vértice) é tal que  $F_i(1,3) \leq F_i(2,3) \leq F_i(3,3)$ . Este procedimento utiliza a função `sort` do Matlab e é executado uma única vez para

toda a matriz. No passo seguinte são retiradas as faces que são paralelas ao plano xoy, ou seja são retiradas as faces  $F_i$  tais que  $F_i(1,3)=F_i(2,3)=F_i(3,3)$ . Estas faces são retiradas para simplificar o processo de determinar as faces que são intersectadas por um dado plano de corte. Esta instrução também é executada uma única vez para toda a matriz e utiliza a instrução find.

Uma vez estabelecidas as condições iniciais dá-se início ao processo de seccionamento para cada plano de corte  $z=z_i$ . Para cada  $z_i$  o algoritmo começa por encontrar todas as faces que são estritamente intersectadas pelo plano  $z=z_i$  ou seja todas as faces  $F_i$  tais que  $F_i(1,3)<z_i<F_i(3,3)$ . Para contemplar todos os casos possíveis temos o seguinte: caso  $z_i<z_m$ , determinam-se todas as faces cuja aresta inferior é horizontal e está contida no plano  $z=z_i$  ou seja todas as faces  $F_i$  tais que  $F_i(1,3)=z_i=F_i(2,3)$ ; caso  $z_i=z_m$ , determinam-se todas as faces cuja aresta superior é horizontal e está contida no plano  $z=z_m$  ou seja todas as faces  $F_i$  tais que  $F_i(2,3)=z_m=F_i(3,3)$ . Uma vez obtidas as faces que são intersectadas pelo plano de corte corrente, calculam-se os segmentos de recta da intersecção das faces com o plano (apenas para as faces que são estritamente intersectadas, uma vez que para as outras o segmento é a própria aresta) e constrói-se o contorno através da função fazciclos implementada para o efeito (Figura 3.15). Uma vez construído o contorno relativo ao ponto  $z_i$  este é adicionado à matriz C dos contornos, a cota do plano de corte é incrementada e o algoritmo continua o mesmo processo.

A matriz C dos contornos tem o mesmo formato que o da função contourc do Matlab, ou seja é da forma

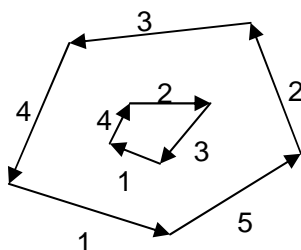
$C=[z_i; n_i, K_{si}, \dots]$  onde  $z_i$  é a cota do plano de corte,  $n_i$  é o número de pontos do contorno e  $K_{si}$  define os pontos do contorno.

A função fazciclos recebe como parâmetros de entrada uma matriz S e um valor  $z_i$ . A matriz S tem dimensão  $p \times 2$  e contém os p segmentos obtidos pela intersecção do plano de corte  $z=z_i$  com as faces da triangulação. Devolve uma matriz Ks com os contornos relativos a esse plano de corte. O algoritmo utilizado para esta função (Figura 3.16) começa com um segmento arbitrário (neste caso o primeiro da lista) e prossegue com a procura dos dois segmentos que lhe são adjacentes, repetindo este processo até fechar o contorno (isto é enquanto



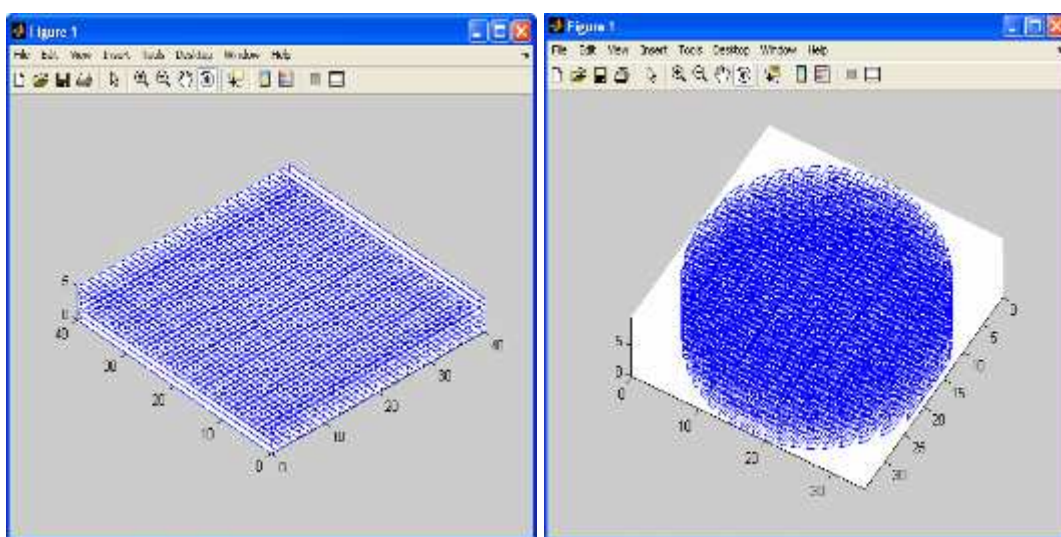
encontrar sempre dois segmentos adjacentes às suas extremidades - que pode ver o mesmo: Figura 3.16). Depois de fechar um contorno, caso já não haja mais segmentos, termina, caso ainda existam segmentos, começa um novo contorno.

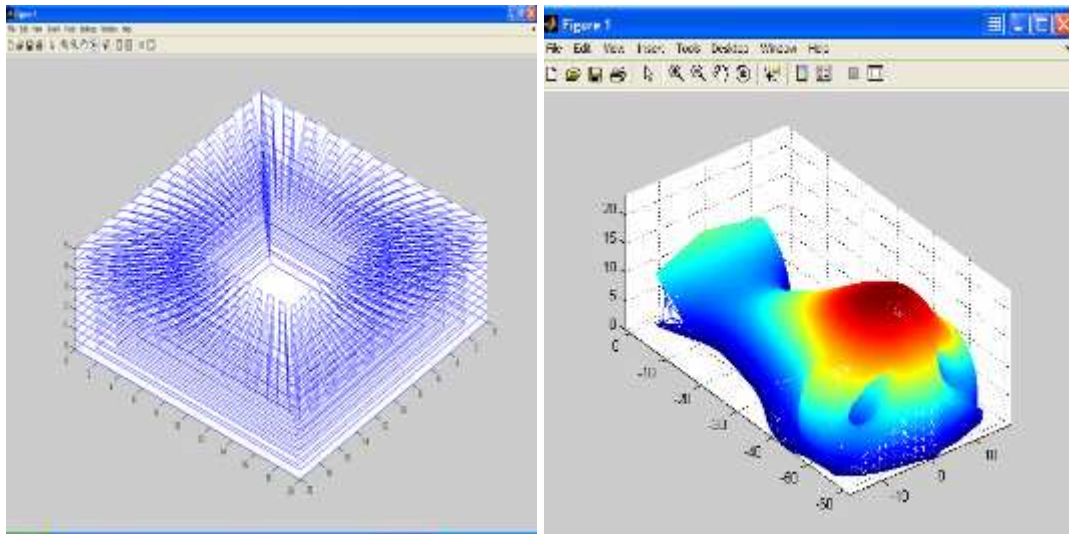
É claro que todas as igualdades acima descritas devem ser entendidas no sentido em que a diferença em módulo entre as duas quantidades é inferior a uma tolerância especificada pelo utilizador.



**Figura 3.16** - Exemplo de selecção dos segmentos de contorno para um plano

Após a organização dos contornos, recorre-se à função `trajectcontour.m` para o cálculo das trajectórias de varrimento (Figura 3.17), assumem-se um varrimento da esquerda para a direita e de baixo para cima em relação ao referencial. As trajectórias de varrimento são armazenadas na matriz “T”, que posteriormente dão origem ao ficheiro de deposição para o equipamento Bioextruder (“filename.prn”) (Figura 3.18).





**Figura 3.17** – Pré-visualização das trajectórias calculadas

Após a criação do ficheiro para o controlo do equipamento Bioextruder, este é enviado através da porta LPT1 para o equipamento dando início à produção do modelo pretendido.

```
;;^IN;!MC0;V55.0;^PR;  
Z0,0,500;  
^PA;J1;!RC10;!MC1;  
Z1000,-1000,0000;  
Z-1000,-1000,00;V8.0;  
Z-1000,1000,00;V8.0;  
Z1000,1000,00;  
Z1000,-1000,00;  
Z-1000,-1000,-50;  
Z-1000,1000,-50;  
Z1000,1000,-50;  
Z1000,-1000,-50;  
Z-1000,-1000,-100;  
Z-1000,1000,-100;  
Z1000,1000,-100;  
Z1000,-1000,-100;  
Z1500,-1000,-100  
!MC0;^IN;J0;
```

**Figura 3.18** – Exemplo do ficheiro de saída para o equipamento Bioextruder

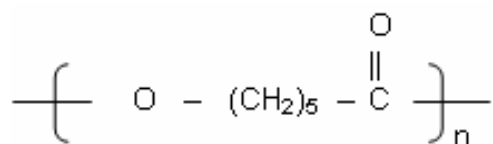
## Capítulo 4 – Resultados Experimentais

### 4.1 Introdução

Este capítulo descreve o trabalho experimental realizado para validação do conceito de sistema de biofabricação aditivo apresentado no capítulo 3. Este trabalho contemplou a obtenção de *scaffolds* com diferentes arquitecturas e porosidades e a avaliação do comportamento biológico (citotoxicidade) do material, policaprolactona, considerado neste estudo.

### 4.2 Material e Técnicas de caracterização utilizadas

A policaprolactona foi um dos primeiros polímeros a ser sintetizado por Carothers no início dos anos 1930. Comercialmente, passou a estar disponível após esforços efectuados no sentido de existirem no mercado, polímeros sintéticos susceptíveis de degradarem por acção de microrganismos. Trata-se de um polímero semi-cristalino com uma temperatura de transição vítrea próxima de -60°C, baixas temperaturas de fusão (58 a 64°C) e compatível com uma grande gama de outros polímeros. A sua estrutura química é indicada na Figura 4.1.



**Figura 4.1** – Estrutura química da policaprolactona

O primeiro trabalho sobre o comportamento *in vivo* do PCL em cápsulas libertadoras de fármacos foi apresentado por Pitt (Pitt *et al* , 1981). Este material é susceptível de degradação por acção enzimática e não enzimática. Woodward (Woodward *et al*, 1985) estudou o mecanismo de degradação intracelular de pós de PCL (106 a 500 µm) de baixo peso molecular ( $M_n \approx 3000$ ) em ratos. Os resultados sugerem que *in vivo*, o processo de degradação intracelular por acção

enzimática é o fenómeno principal mas que apenas ocorre após o polímero ter sofrido suficiente pré-degradação por acção não enzimática (hidrólise).

Outra importante característica do PCL é a sua elevada estabilidade térmica, possuindo temperatura de decomposição mais elevada ( $\approx 350^\circ\text{C}$ ) que outros poliésteres alifáticos (temperaturas de decomposição entre  $235$  e  $255^\circ\text{C}$ ).

Para efeitos de teste foi considerado neste trabalho de investigação uma policaprolactona de designação comercial CAPA 6500, fornecida pela empresa Solvay. As principais características técnicas obtidas do fornecedor são indicadas na Tabela 4.1.

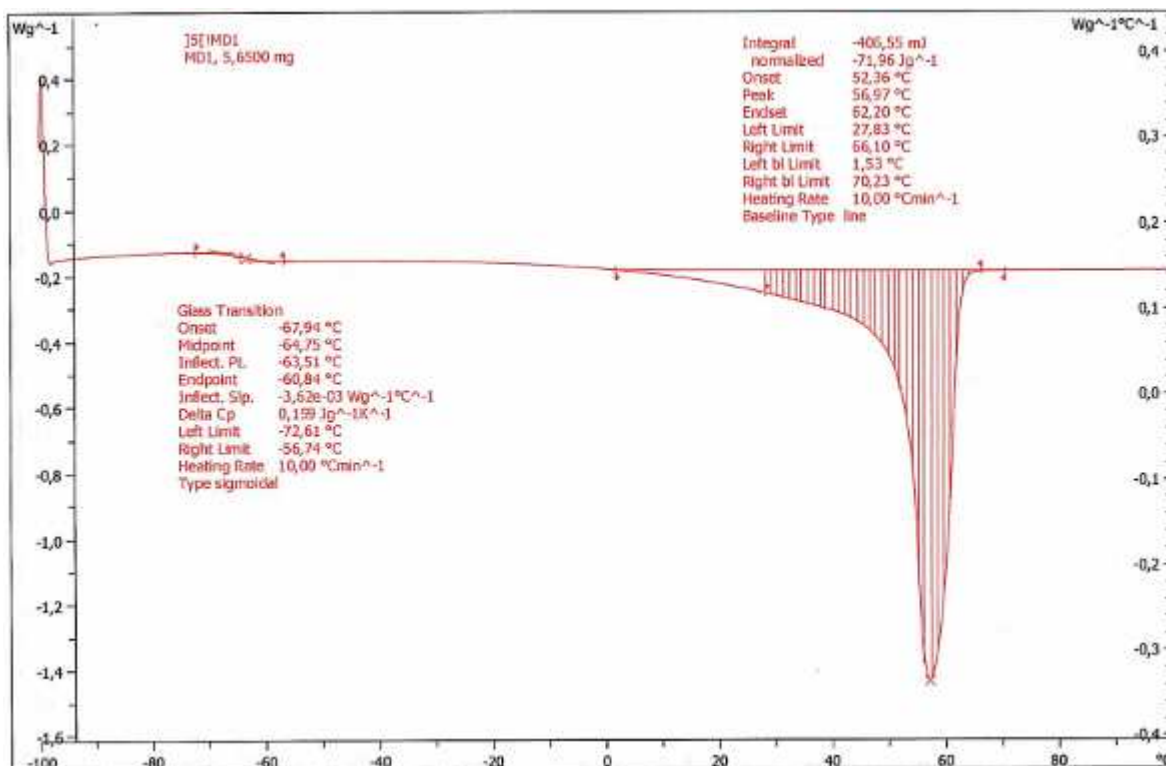
**Tabela 4.1** - Principais características da policaprolactona utilizada

| Propriedades da CAPA 6500 |                                      |
|---------------------------|--------------------------------------|
| Forma fornecida           | Grão (tamanho médio 3 mm)            |
| % Água                    | < 1%                                 |
| Viscosidade               | 1.5 KPa.s @ ( $100^\circ\text{C}$ ). |
| Densidade                 | 1.4 g/cm <sup>3</sup>                |

A avaliação da temperatura de fusão, parâmetro importante de processamento, foi efectuada por Calorimetria Diferencial de Varrimento, apresentando-se o termograma correspondente na Figura 4.2. A temperatura de fusão obtida foi de  $67.73^\circ\text{C}$ .

A calorimetria diferencial de varrimento (DSC) é uma técnica utilizada para determinar a cinética de processos químicos exotérmicos ou endotérmicos. O calor gerado ou absorvido durante um determinado fenómeno pode ser medido directamente por um sistema de DSC e as curvas da taxa de geração de calor ou de absorção em relação ao tempo (análises isotérmicas), ou temperatura (análises dinâmicas ou não exotérmicas) facilmente obtidas. O sistema DSC utilizado neste trabalho foi o Setaram DSC131. Este calorímetro utiliza o princípio de Tian-Calvet, células cilíndricas em alumínio para a colocação do material e para a referência e termopilhas como transdutores de fluxo de calor. O sistema

regista a diferença entre os fluxos de calor do bloco para amostra e para a referência em função da temperatura da amostra.



**Figura 4.2** – Calorimetria diferencial de varrimento de polycaprolactone 6500

A avaliação de eventuais alterações atômicas resultante do processamento foi efectuada por Ressonância Magnética Nuclear (NMR - *Nuclear Magnetic Resonance*).

A NMR é uma técnica de caracterização de materiais que mede a absorção de radiação electromagnética por um material na região da rádio frequência, estimulando transições entre níveis energéticos. A ressonância ou transição de rotação nuclear caracteriza-se por:

- Apenas os núcleos com carga criam um campo magnético;
- Os núcleos possuem um número quântico de rotação nuclear,  $I$ ;
- Os núcleos com  $I=1/2$  quando na presença de um campo magnético externo podem apresentar duas orientações: paralela (menor energia) e anti-paralela (maior energia);

- Os núcleos que se encontram com orientação paralela ao campo, necessitam de absorver energia para transitarem para o estado anti-paralelo – fenómeno de ressonância
- A quantidade de energia absorvida depende da identidade do núcleo,  $\gamma$ , e da intensidade do campo magnético aplicado, ou seja,

$$E_{\text{absorvida}} = (E_{-\frac{1}{2}} - E_{\frac{1}{2}}) = h\nu$$

com

$$\nu = \gamma \frac{B}{2\pi}$$

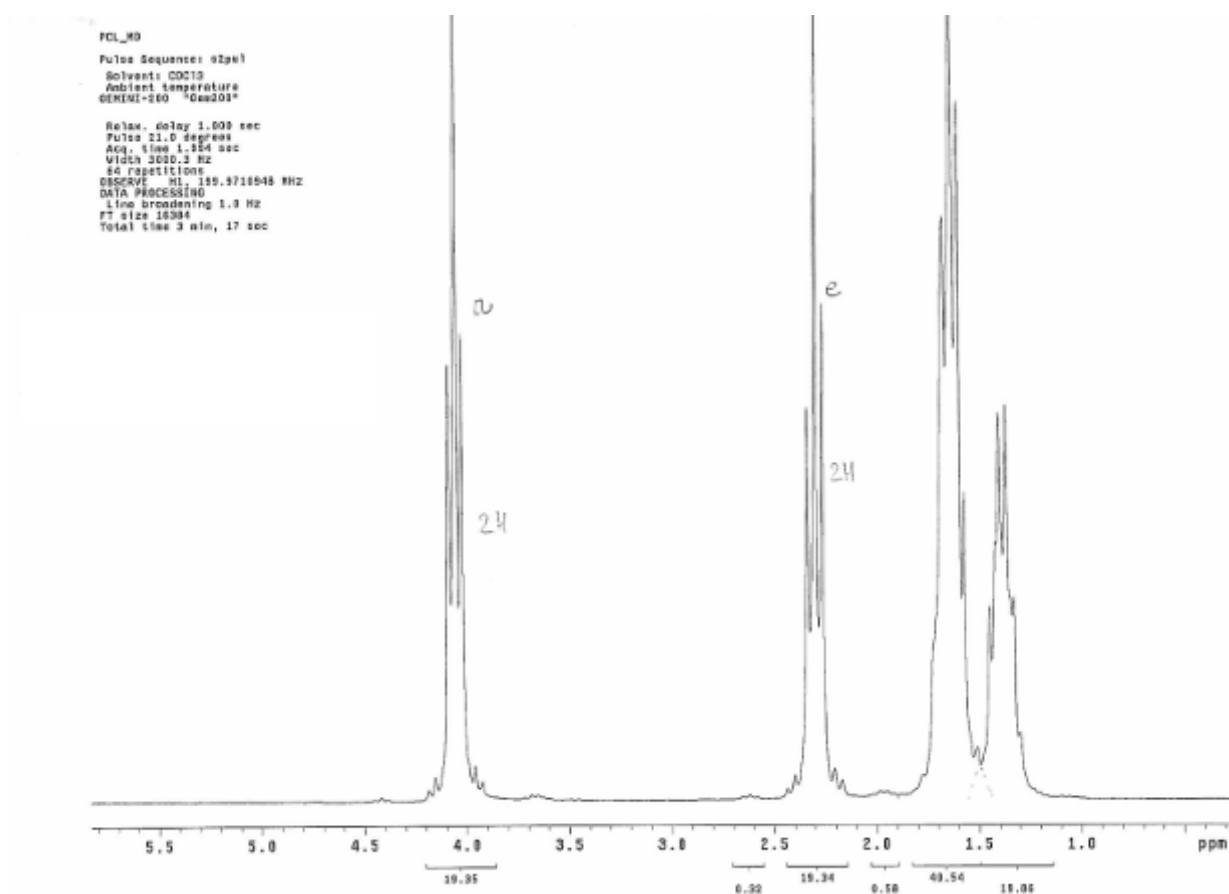
sendo  $\nu$  a frequência,  $\gamma$  a constante giromagnética e B a intensidade do campo magnético aplicado.

- A avaliação da energia absorvida por um determinado protão ou da intensidade do campo magnético eficaz para provocar ressonância de um determinado protão é analisada em função dos protões de um composto de referência.

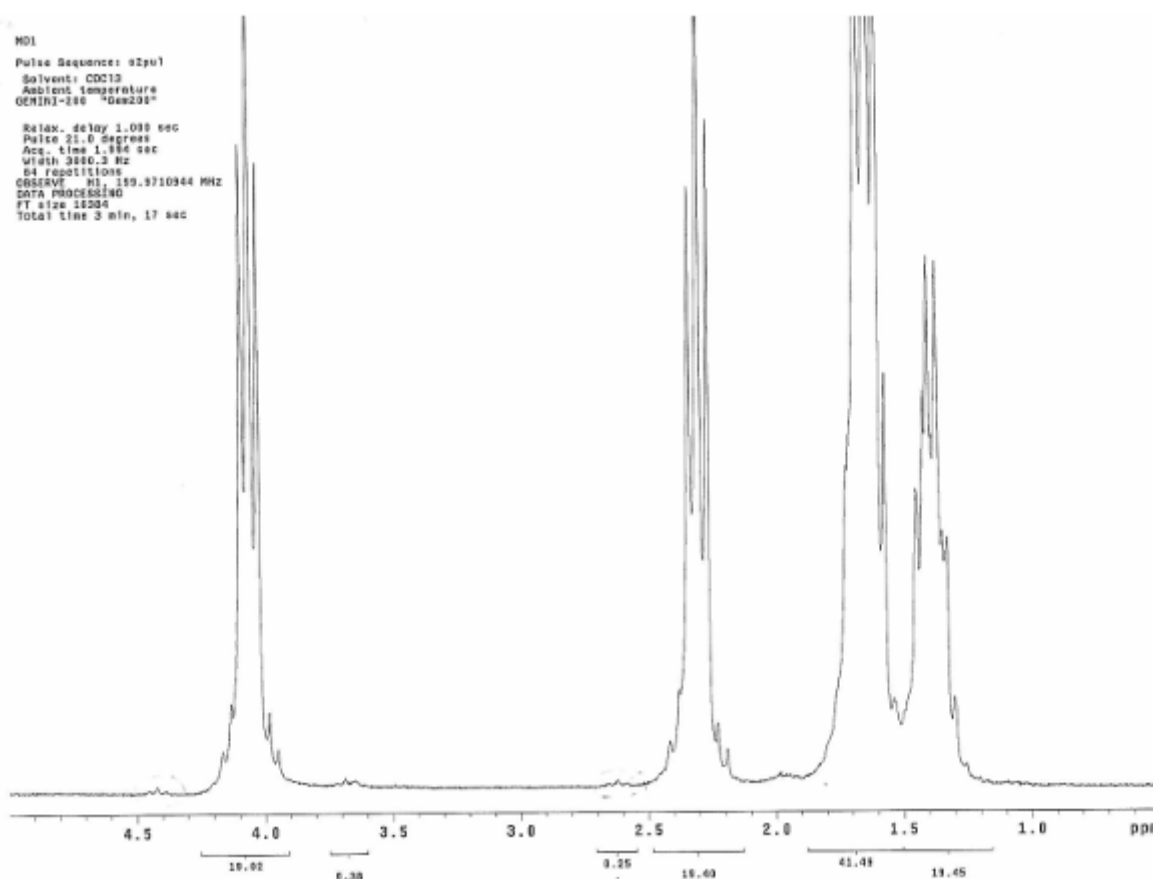
Para a grande maioria dos materiais poliméricos o núcleo de hidrogénio,  $^1H$ , é o que existe em maiores concentrações sendo por isso aquele que tem sido mais sujeito a aplicações de ressonância magnética. Outros núcleos comumente sujeitos a análise são  $^{13}C$  e  $^{19}F$ . A ressonância com protões de hidrogénio ( $^1H$  RMN) apresenta maior sensibilidade que a ressonância com carbono ( $^{13}C$  RMN).

O equipamento utilizado para realizar a análise NMR foi o espectómetro ( $^1H$  RMN), Varian Gemini 200. Em termos de análise química de compostos, este tipo de análise serviu basicamente para determinar se a molécula apresentava qualquer alteração a nível estrutural provocada pelo processo de fabrico, ou seja, permitiu analisar se a molécula se tinha degradado ou não, devido á temperatura de fabrico usada. Os resultados da análise são apresentados nas Figuras 4.3 e Figura 4.4, sendo possível observar que os picos de ressonância são

basicamente os mesmos quer para o material não processado quer para o processado, apresentando uma pequena variação na sua amplitude, que se poderá dever a diferenças de concentração da solução utilizada. Por comparação dos resultados é possível concluir-se não ter havido qualquer alteração ao nível da estrutura química da molécula de PCL, encontrando-se os picos correspondentes aos átomos de carbono, hidrogénio e oxigénio na mesma posição relativa quer no material não processado quer no material processado.



**Figura 4.3** - Espectro de ressonância magnética nuclear para o material não processado

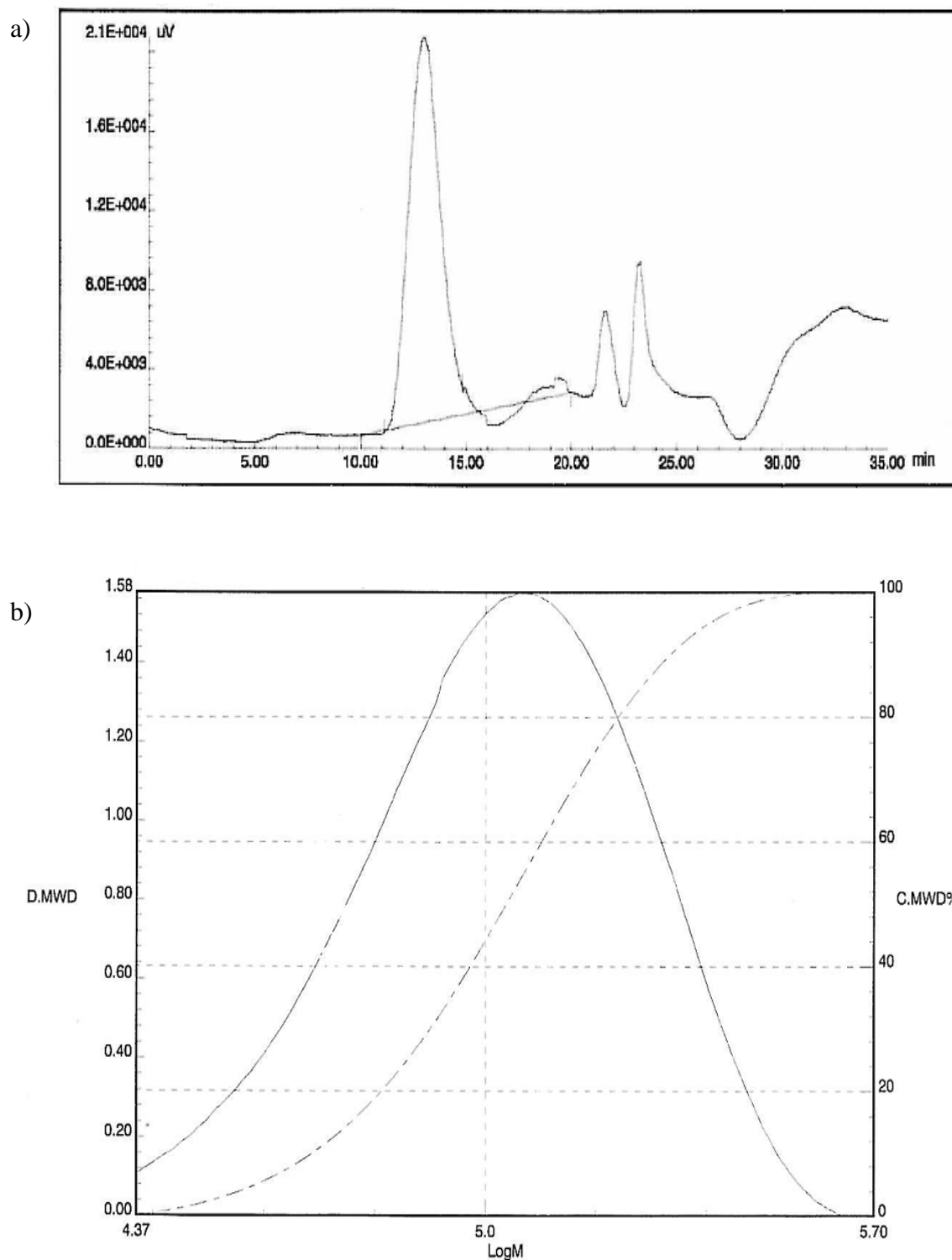


**Figura 4.4** - Espectro de ressonância para o material processado

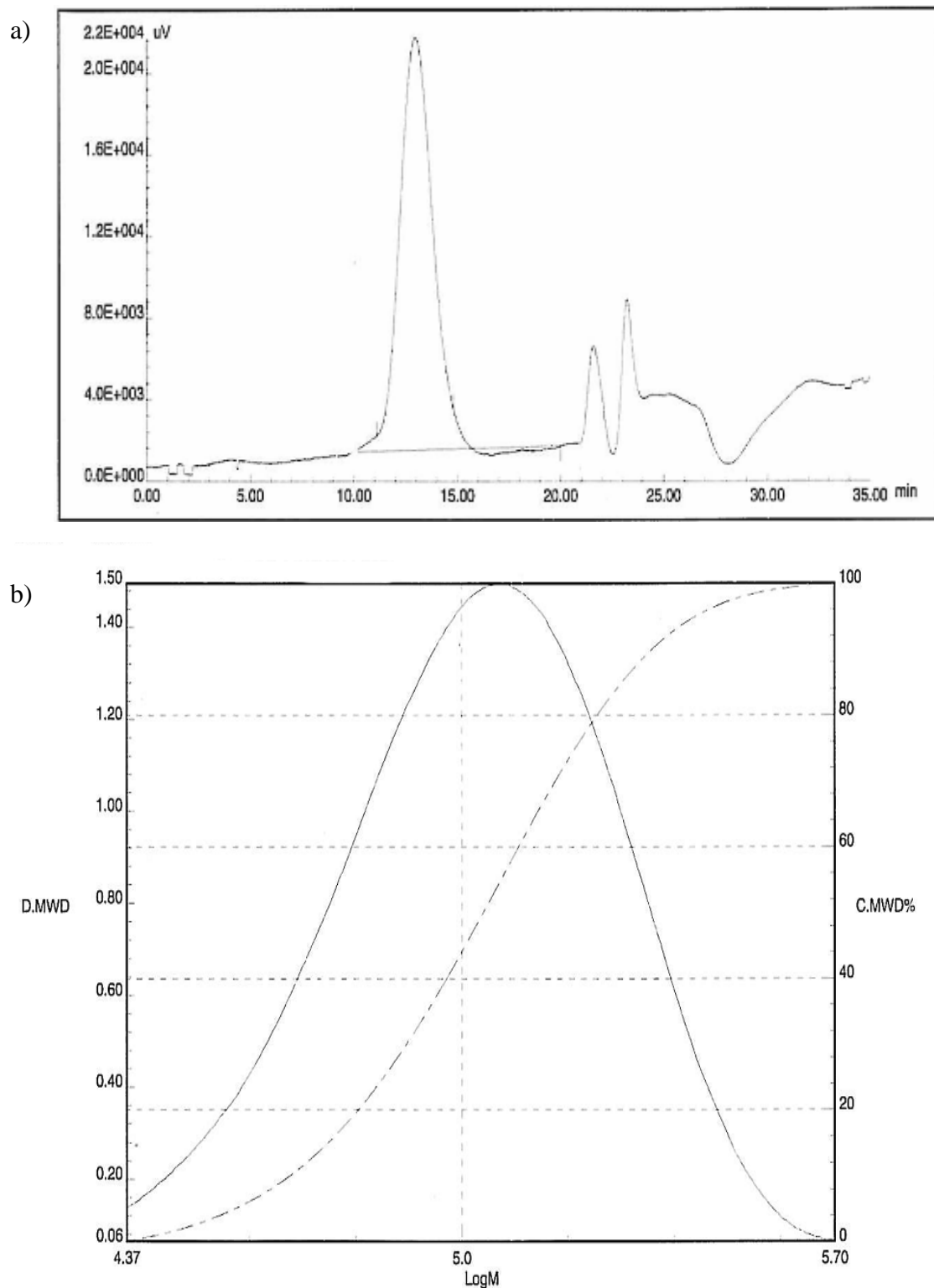
A determinação da massa molar ( $M_n$ ) número, peso e médias ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_z$ ) assim como da distribuição da massa molar (polidispersividade) foi determinada por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC). A técnica de GPC também designada por cromatografia por exclusão de tamanho é extensamente utilizada para a determinação dos pesos moleculares médios e das distribuições moleculares dos polímeros, sendo uma técnica de separação de componentes individuais de uma amostra complexa. O material em análise passa através de uma estrutura porosa onde as moléculas são separadas de acordo com os seus tamanhos. Para a análise GPC foi utilizado um cromatógrafo PU-1580 HPLC da Jasco, conectado a um detector inteligente da Jasco (830-RI) e um espectrómetro fotométrico da PerkinElmer LC-75 equipado com duas colunas de mistura PLgel 5  $\mu$ m. Os cromatogramas e as curvas de distribuição de massa molar para o material processado e não processado são apresentados nas Figuras 4.5 e 4.6. Os valores mais significativos resultantes da análise de GPC são apresentados na



Tabela 4.2. Os resultados mostram que o peso molecular da amostra não foi alterado pelo processo de fabrico, verificando-se mais uma vez não ter ocorrido uma degradação da molécula de PCL através da quebra de ligações químicas.



**Figura 4.5** – a) Cromatograma , b) Curva de distribuição para o material processado



**Figura 4.6** – a) Cromatograma , b) Curva de distribuição para o material não processado

**Tabela 4.2**– Valores de massa molar ( $M_n$ ) número, peso e médias ( $M_n$ ,  $M_w$ ,  $M_z$ ) obtidos por GPC

| Valores obtidos por GPC |                |            |
|-------------------------|----------------|------------|
|                         | Não processado | Processado |
| $M_n$                   | 89507          | 89837      |
| $M_w$                   | 127554         | 122991     |
| $M_z$                   | 173883         | 159452     |
| $M_v$                   | 127554         | 122991     |
| $M_z / M_w$             | 1.3632         | 1.2965     |

### 4.3 Produção de *scaffolds*

Para a produção de *scaffolds* foram consideradas as condições de processamento indicadas na Tabela 4.3:

**Tabela 4.3** – Condições de processamento para o material CAPA 6500

| Condições de processamento            |           |
|---------------------------------------|-----------|
| Temperatura do reservatório           | 75 °C     |
| Pressão reservatório                  | 6 bar     |
| Velocidade de rotação do fuso         | 30 r.p.m. |
| Temperatura do corpo de extrusão      | 70 °C     |
| Diâmetro do bico de extrusão          | 0.25 mm   |
| Velocidade de deposição               | 8 mm/s    |
| Velocidade de varrimento              | 8mm/s     |
| Incremento em z                       | 0.2 mm    |
| Incremento em x                       | 1 mm      |
| Incremento em y                       | 1 mm      |
| Distância entre o bico e a plataforma | 0.2 mm    |

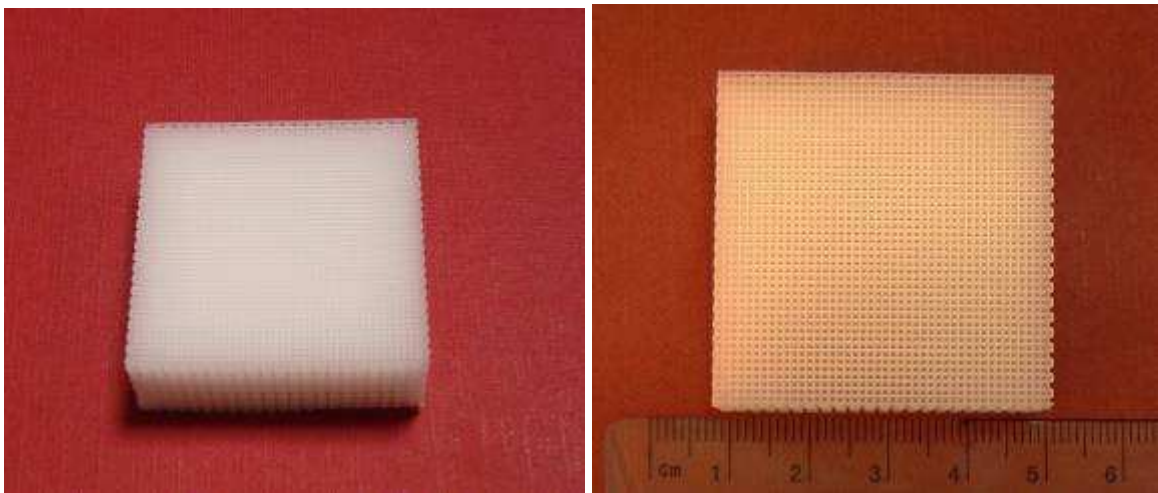
A porosidade foi determinada de acordo com:

$$Porosidade = 1 - \frac{\rho^*}{\rho_{sub}}$$

onde  $\rho^*$  é a densidade da estrutura celular e  $\rho_{sub}$  é a densidade da substância que lhe deu origem.

Para as estruturas produzidas, e como os parâmetros de processamento foram iguais, a porosidade média obtida foi de 76%.

As estruturas porosas produzidas apresentam poros de dimensão aproximada 650  $\mu\text{m}$  com estrutura geométrica regular de forma quadrada. As diversas estruturas obtidas são indicadas nas Figuras 4.7 a 4.10.



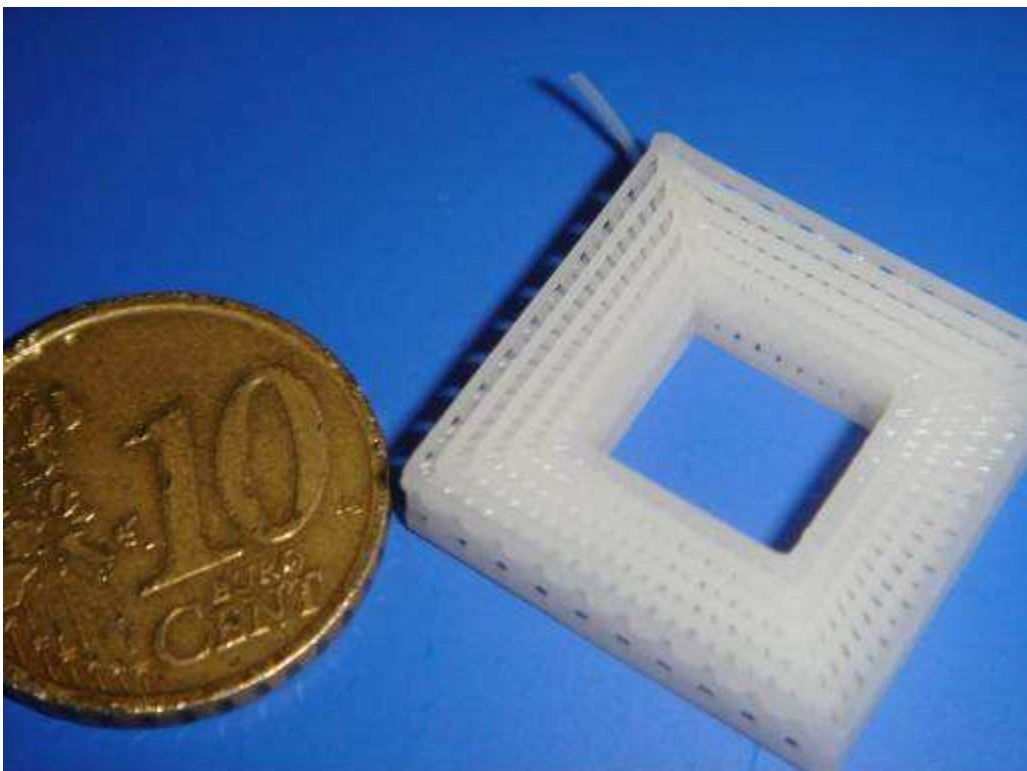
**Figura 4.7** – Imagem *scaffold* produzido com 50x50x20 mm.



**Figura 4.8** – Imagem *scaffold* produzidos com 50x50x8 mm.

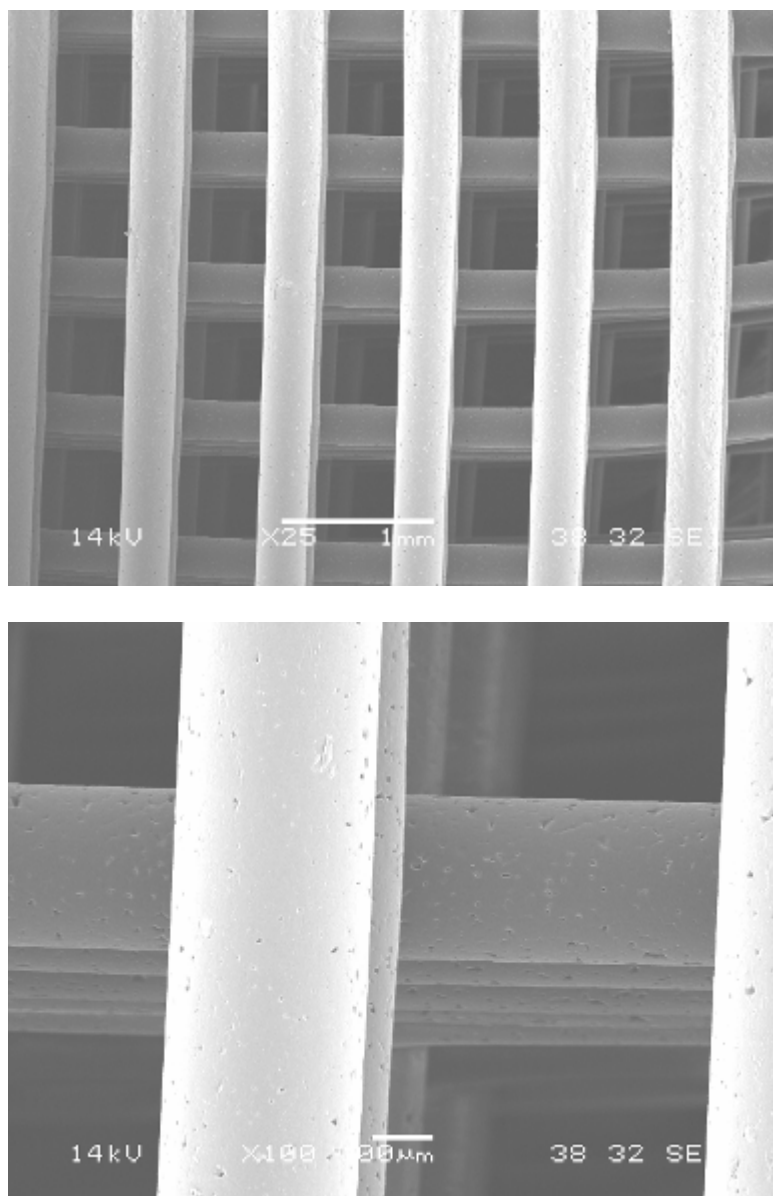


**Figura 4.9** – Imagem *scaffold* redondo diâmetro 25 com altura de 10 mm.



**Figura 4.10** – Imagem *scaffold* quadrado 30x30, furo quadrado 10x10 e altura 5 mm

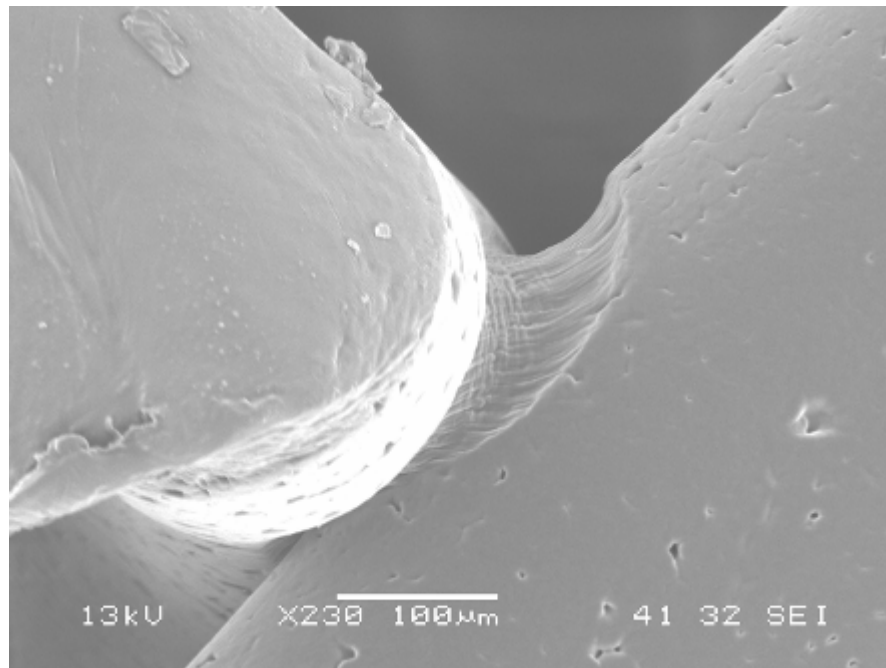
De maneira a avaliar-se a interconectividade entre poros, a adesão entre camadas, a qualidade filamentar e a continuidade da deposição recorreu-se a microscopia electrónica de varrimento, SEM (*Scanning electron microscopy*). Na Figura 4.11 apresentam-se imagens micrográficas de uma estrutura porosa obtida, sendo possível observar-se a grande regularidade geométrica do poro, a sua distribuição uniforme e a regularidade dimensional do filamento.



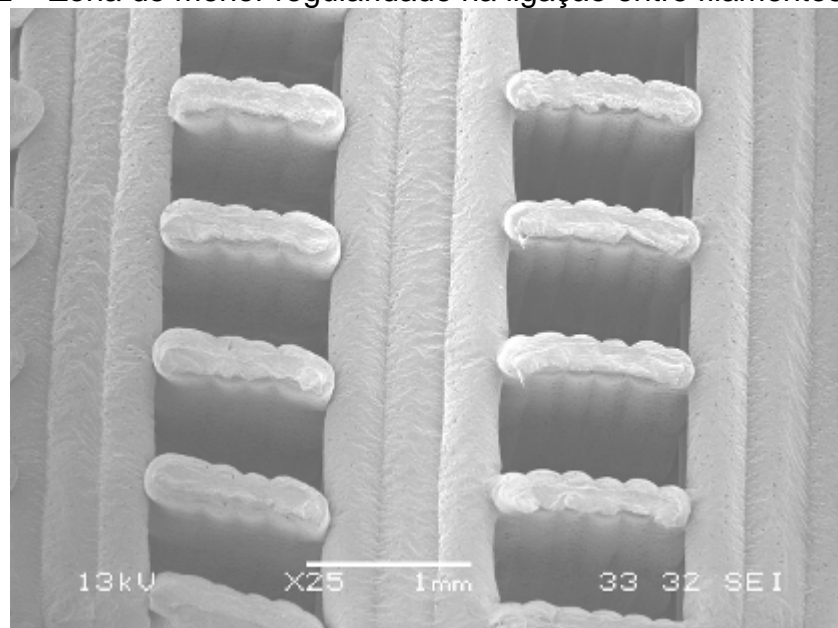
**Figura 4.11** – Micrografia de uma estrutura porosa em PCL

Durante a fase de deposição e consequência dos esforços mecânicos a que o filamento está sujeito durante a deposição, assim como a gradientes

térmicos decorrentes de processos de solidificação temporalmente extintos entre o filamento a depositar e o previamente depositado, observam-se algumas zonas de descontinuidade tal como se indica na Figura 4.12. Muito embora não se tenha realizado qualquer tipo de ensaio mecânico sobre os scaffolds produzidos, a análise morfológica destas estruturas revela uma boa adesão entre camadas, tal como se indica na Figura 4.13.

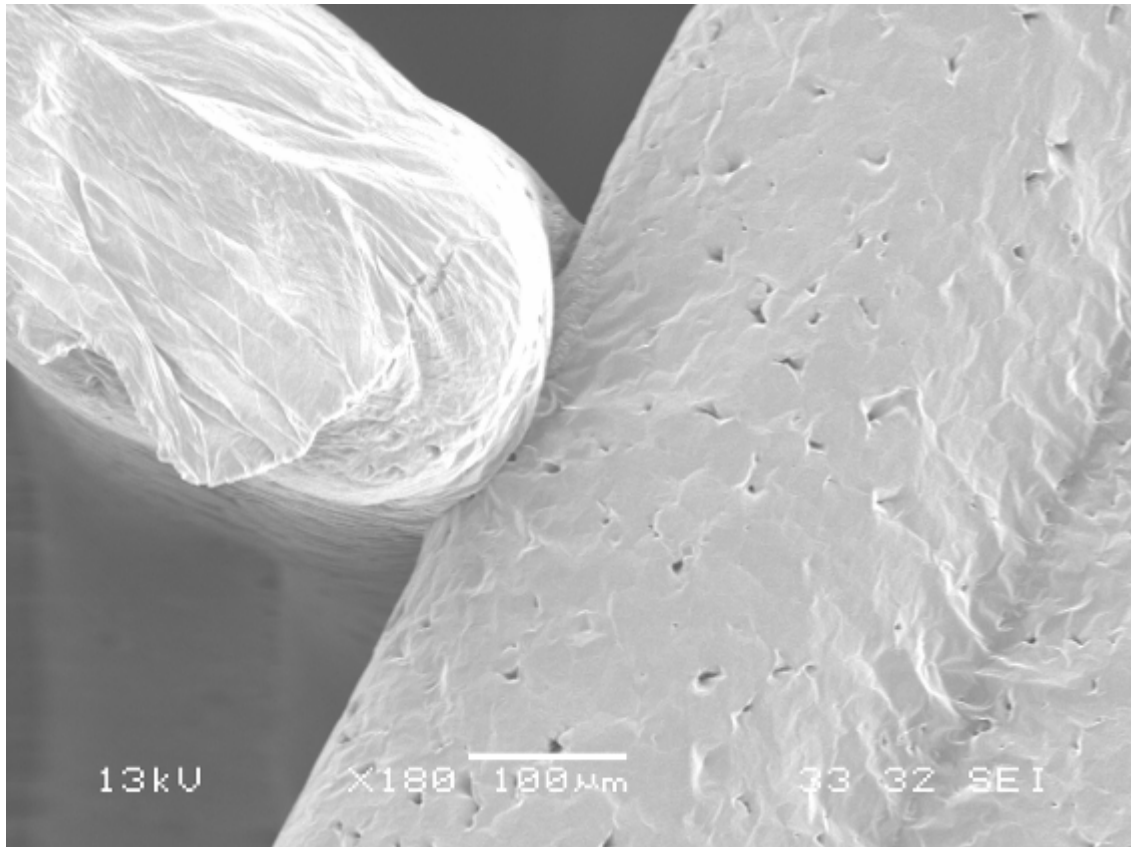


**Figura 4.12** – Zona de menor regularidade na ligação entre filamentos



**Figura 4.13** – Micrografia do scaffold que evidencia uma continuidade de ligação entre filamentos

A análise de cada filamento, que constitui o scaffold, mostra a existência de pequenos poros de dimensão inferior a 10  $\mu\text{m}$  distribuídas de forma irregular, tal como se indica na Figura 4.14



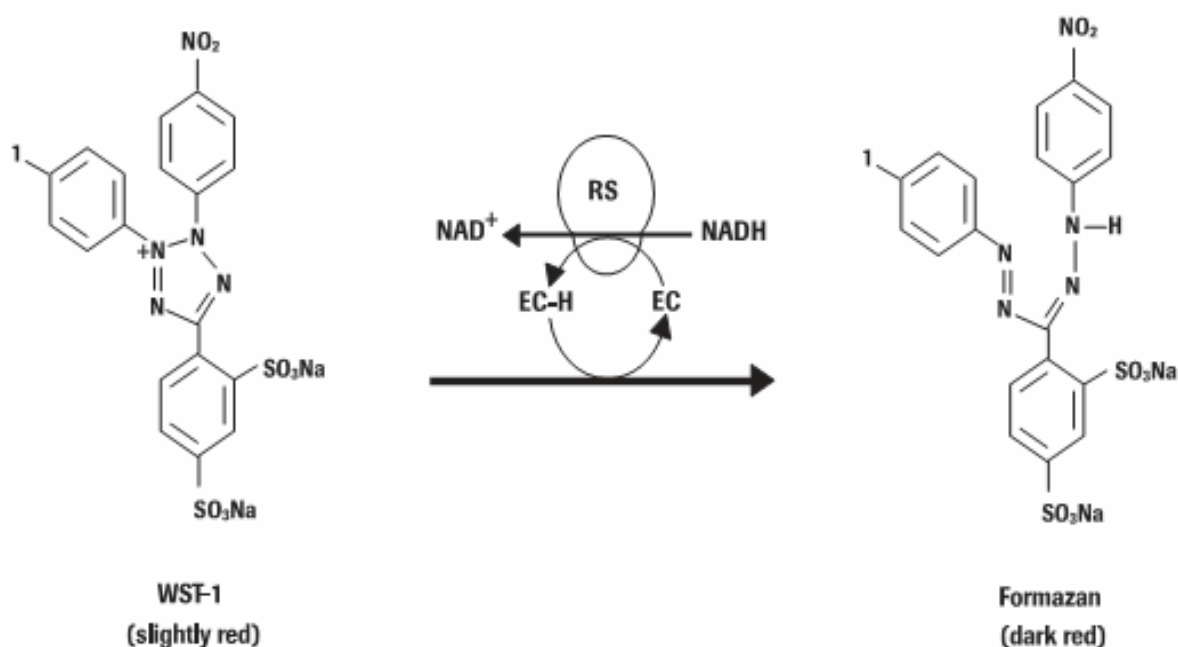
**Figura 4.14** - Filamento de scaffolds com poros de pequena dimensão distribuídos de forma irregular

Os pequenos poros observados nos filamentos, assim como algumas irregularidades que se observam principalmente na ligação entre filamentos, poderão estar relacionado com mudanças bruscas de direcção, velocidades de varrimento elevadas e eventuais bolha de ar aprisionadas no material durante a extrusão.



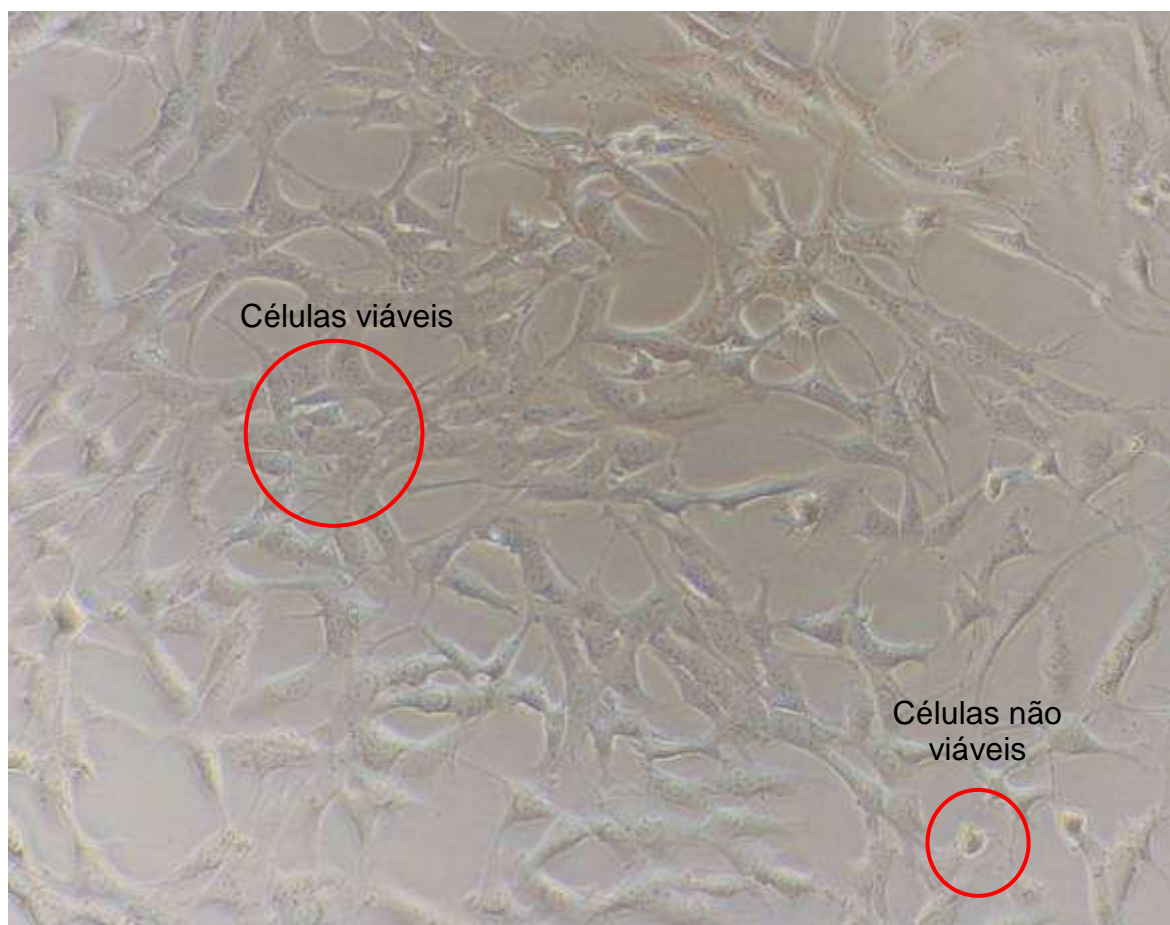
#### 4.4 Citotoxicidade

Um aspecto fundamental para a avaliação da biocompatibilidade de um biomaterial é a avaliação da sua citotoxicidade. Um material é definido como tóxico quando liberta substâncias químicas em quantidade suficiente para matar células de forma directa ou indirecta, ou ainda quando inibe de forma substancial a actividade metabólica celular. A proliferação celular, ou seja a avaliação da citotoxicidade foi medida usando um kit de proliferação celular e sal de tetrazólio WST-1. O composto tetrazol modificado é reduzido a formazan (marcador solúvel em água) por células metabolicamente activas sob acção de uma desidrogenase. A produção de formazan é proporcional ao número de células viáveis na cultura, sendo por isso uma medida da proliferação celular em função do tempo. Para este teste realizado de acordo com o procedimento indicado no Anexo 1 utilizaram-se fibroblastos 3T3 Clone A31. Na Figura 4.15 indica-se o mecanismo de redução do composto tetrazólico (WST-1) a formazan por acção de enzimas mitocondriais nas células metabolicamente activas.

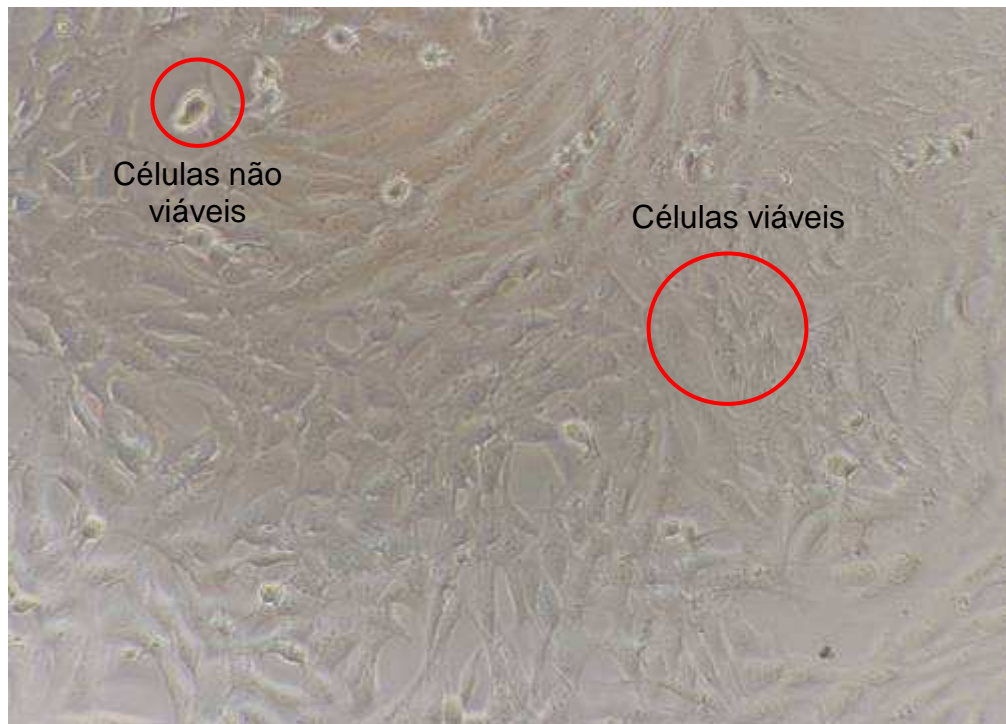


**Figura 4.15** - Redução do composto tetrazólico (WST-1) a formazan.

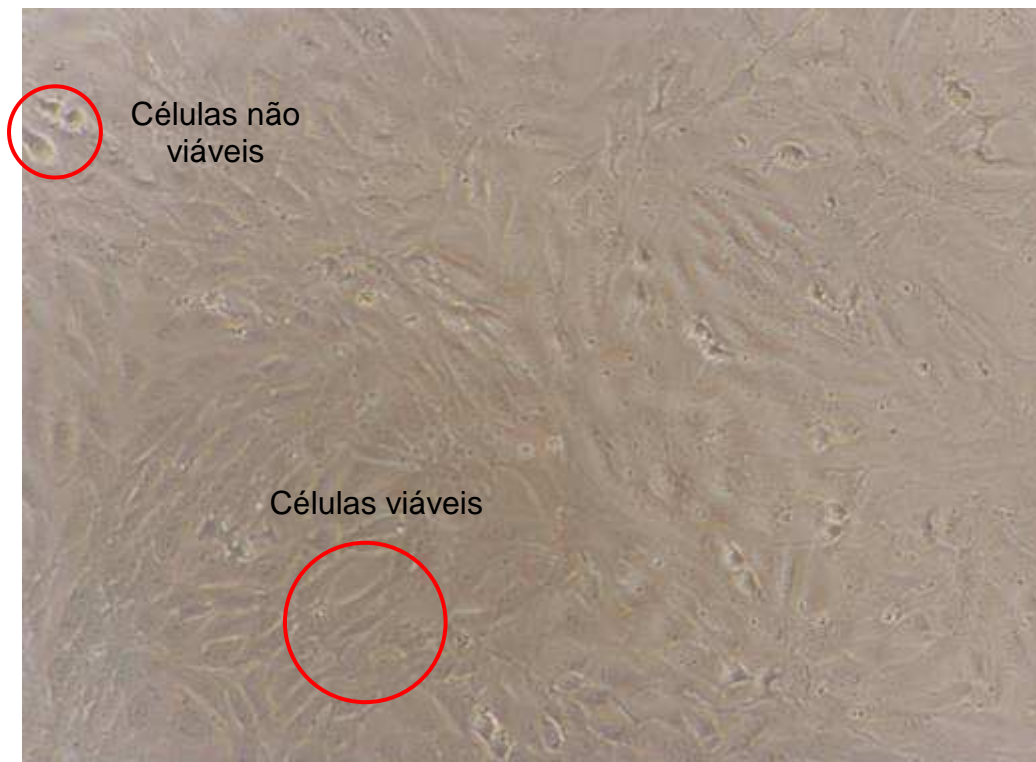
Tendo em conta as características do material a testar, tanto no seu estado puro como pós-processado, utilizou-se o teste de diluição de extractos de material (diluição 1:1 e 1:4) em solução de terreno de cultura completo DMEM apropriado para linhas celulares do tipo fibroblatos 3T3 Clone A31 (Figura 4.16, 4.17 e 4.18). A escolha do solvente foi feita tendo em consideração que este deveria ser compatível com as características físico-químicas do material (solvente), ou seja, não deveria alterar a estrutura cristalina do material, não causar hidrólise ou afectar de algum modo as ligações covalentes da estrutura.



**Figura 4.16** - Extracto não diluído com a inclusão de fibroblatos 3T3 Clone A31.



**Figura 4.17** - Extracto diluído numa proporção 1:1 em terreno de cultura completo DMEM com a inclusão de fibroblatos 3T3 Clone A31.



**Figura 4.18** - Extracto diluído numa proporção 1:4 em terreno de cultura completo DMEM com a inclusão de fibroblatos 3T3 Clone A31.

A preparação das amostras para efectuar os testes de citotoxicidade foi feita de acordo com a norma ISO10993-2 de avaliação biológica de dispositivos médicos (*Biological Evaluation of Medical Devices: Cytotoxicity*), que refere que todo o material antes de ser analisado deve ser convenientemente limpo e esterilizado, bem como possuir um rácio volume de solução/área superficial de amostra adequado.

A análise de citotoxicidade foi realizada incubando 0.02g/ml de extractos de material processado e não processado com terreno de cultura completo DMEM, durante 48 horas a uma temperatura de 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

Uma monocamada subconflente de fibroblastos 3T3/A31 foi tripsinizada através do uso de uma solução de tripsina 0.25% 1mM EDTA. As células foram incubadas durante 5 minutos, agitadas e re-dispersas novamente em terreno DMEM a fim de serem contadas.

Foram preparadas diversas soluções de modo a obter  $3 \times 10^3$  células por cada 100µl de terreno, o que representa o volume final de cada poço de uma placa de 96 poços. As placas foram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas até atingirem uma confluência de 60-70%. O terreno de cada poço foi removido e substituído por terreno novo contendo diferentes concentrações do material sob investigação. As células de controlo foram incubadas com terreno de cultura novo, permanecendo os poços que continham apenas terreno de cultura como controlo.

Após 24 horas de incubação da placa de 96 poços contendo células mais terreno, adicionou-se em cada poço um reagente de proliferação celular denominado WST-1, (diluído 1:10 de acordo com as instruções do fornecedor) e voltou-se a incubar, desta vez durante 4 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

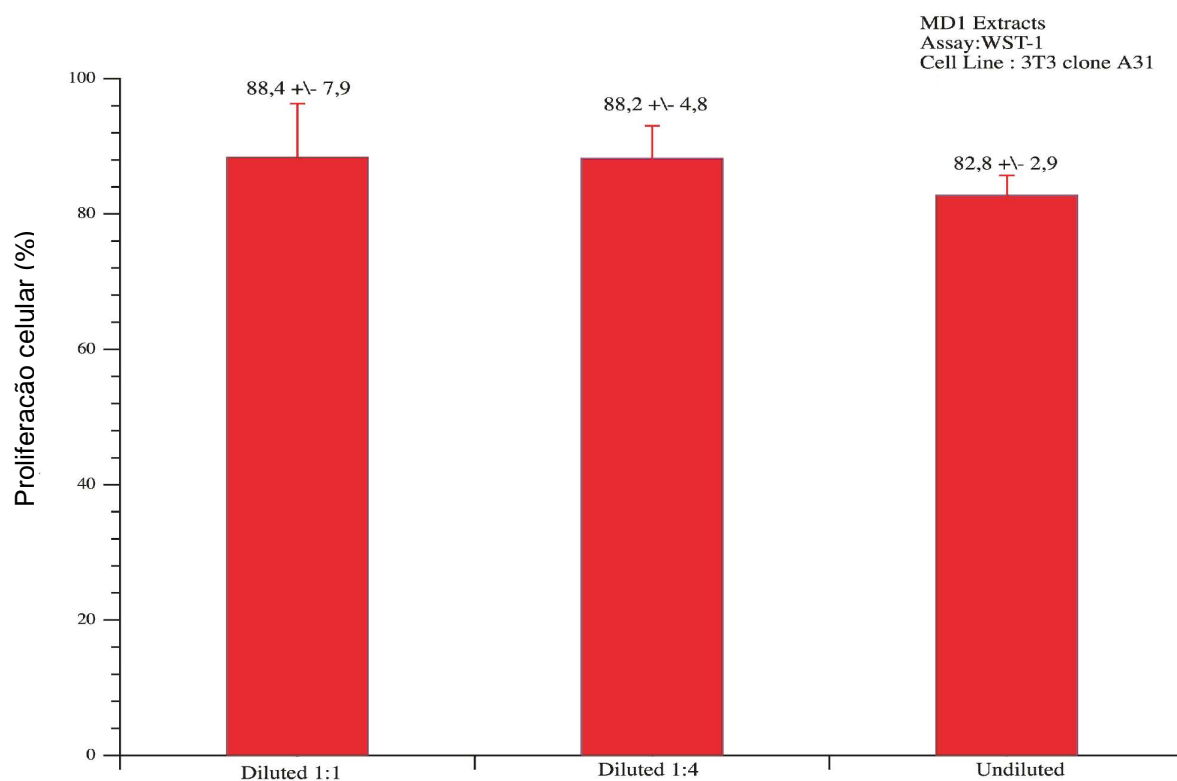
A placa foi de seguida analisada com um *Bio-Rad Benchmark Microplate Reader*. O número de células vitais foi obtido através da leitura do nível de absorvência da amostra menos o nível de absorvência da coluna de controle contendo apenas terreno mais WST-1, a um comprimento de onda de 450 nm e com um comprimento de onda de referencia de 620 nm.

De seguida todos os dados foram processados usando um *Microplate Reader III (Biorad)* e *Igor Pro (Wave-Metrics)*.

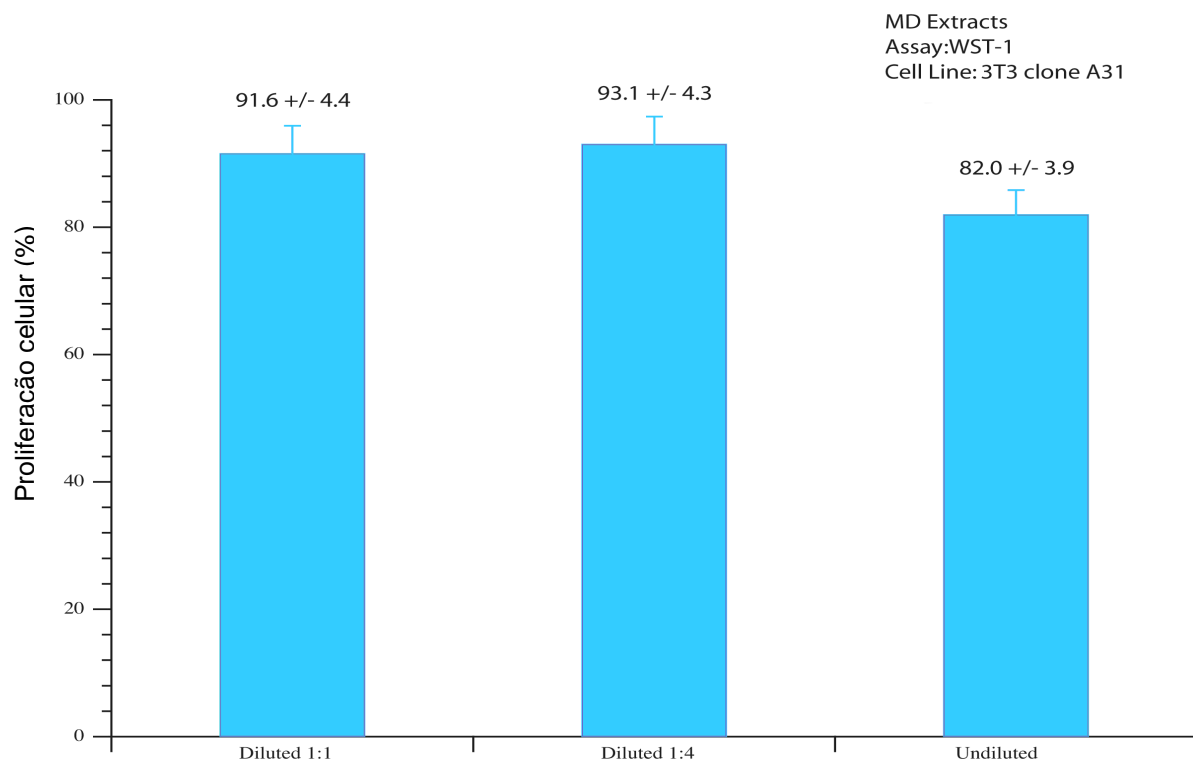
O formazan formado durante este processo pode ser quantificado através de um espectrofotómetro multiwell de varrimento (leitor ELISA), medindo a absorção da solução catalizada num apropriado comprimento de onda (entre 420-480 nm, sendo que o comprimento de onda de referência deve ser superior a 600 nm).

Os resultados da viabilidade celular para o material não processado e para o material processado são apresentados nas Figuras 4.19 e 4.20. Os resultados mostram uma pequena diferença em termos de penetração celular nas amostras diluídas com estratos de material processado e não processado. Estas pequenas diferenças podem ser explicadas devido ao processo de cultura ser manual, e desta forma ser quase inevitável a presença de pequenos erros, tal como diferenças de concentração da solução, inerentes ao operador.

Em qualquer dos casos a viabilidade celular é bastante elevada, sendo sempre superior a 80%, o que nos permite concluir que as condições de fabrico utilizadas não induziram nenhum nível de citotoxicidade que possa ser maléfico para a normal actividade metabólica das células.



**Figura 4.19** – Proliferação de células em material após processamento por Bioextrusão



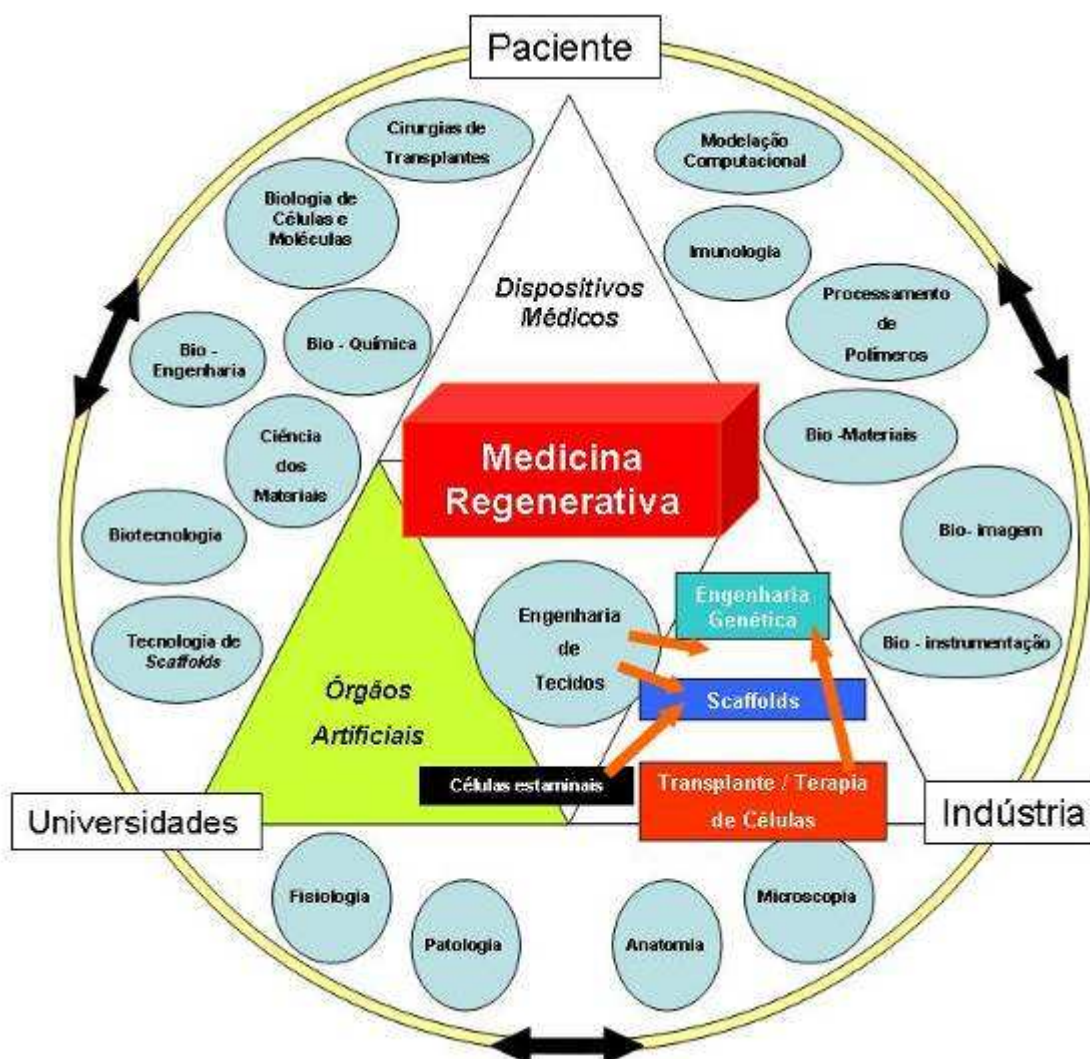
**Figura 4.20** – Proliferação de células em material antes do processamento



## Capítulo 5 - Conclusões e trabalhos futuros

## 5.1 Conclusões

Fruto do envelhecimento populacional e da escassez de órgãos desenvolveu-se nos últimos anos uma nova disciplina designada por engenharia de tecidos muitas vezes designada também por medicina regenerativa. Esta disciplina multidisciplinar (Figura 5.1) trata do desenvolvimento de estratégias destinadas à reparação ou substituição de tecidos e órgãos danificados, doentes ou metabolicamente deficientes.



**Figura 5.1** – Medicina regenerativa como domínio de investigação multidisciplinar

A este nível a abordagem mais utilizada consiste na utilização de células retiradas ao paciente, cultivadas *in vitro* e depositadas sobre matrizes de suporte porosos produzidos em materiais biodegradáveis e biocompatíveis. Esta estrutura híbrida é então implantada na zona afectada, esperando-se que a regeneração do novo tecido acompanhe o desaparecimento do suporte. Estas estruturas (*scaffolds*) devem possuir uma arquitectura capaz de garantir a adesão celular, o fornecimento de oxigénio, nutrientes, etc. às células e estabilidade mecânica durante o processo de regeneração dos tecidos.

As actuais técnicas de fabricação aditiva de *scaffolds* garantem elevada porosidade e interconectividade entre poros com dimensões suficientes para suportar fenómenos de adesão e diferenciação celular. As diferentes técnicas existentes forma descritas com detalhe no capítulo 2 onde se apresentaram exemplos de aplicação em engenharia de tecidos. Contudo as técnicas comercialmente disponíveis pecam pelo reduzido número de materiais com que operam estando por isso limitados a aplicações ou de tecidos duros ou de tecidos moles. Esta dissertação pretende constituir a base de um novo conceito de biofabricação baseado em princípios de extrusão de materiais poliméricos e/ ou compósitos polímero/cerâmico e ainda na impressão de materiais de baixa viscosidade que permitam o encapsulamento de células. O conceito inerente a este sistema designado por Bioextruder foi apresentado no capítulo 3, para tal desenvolveu-se um sistema que possui uma plataforma móvel, concebido para operar múltiplos materiais produzindo assim *scaffolds* heterogéneos com janelas de processamento suficientemente largas. Neste trabalho procedeu-se a toda a concepção e montagem do sistema que permite ainda, por substituição dos bicos de extrusão construir-se *scaffolds* com filamentos bastante diferentes. Para o controlo do sistema e processamento da informação digital dos *scaffolds* optou-se inicialmente por em colaboração com a Universidade Tecnológica Federal do Paraná adaptar-se o software RP3 ao sistema Bioextruder. Contudo as dificuldades observadas no processamento de ficheiros STL de grande dimensão optou-se em seguida pelo desenvolvimento de um código apropriado que para



alem da leitura de ficheiros STL independentemente da sua dimensão, gera de forma automática o seu fatiamento e as instruções para a sua produção. Este código foi ainda pensado no sentido de permitir o fatiamento adaptativo e dessa forma se ajustar no futuro as condições de processamento as características mecânicas desejadas para o *scaffold*. Para teste utilizou-se apenas um material (policaprolactona) bastante utilizado em engenharia de tecidos. *Scaffolds* com configurações dimensões igualmente diferentes possuindo poros de secção quadrada e de dimensão aproximadamente igual a 650  $\mu\text{m}$  foram produzidos. Com a produção das diferentes estruturas e com a repetição da sua fabricação por diversas vezes foi possível atestar-se a fiabilidade e a reprodutibilidade do sistema. Verificou-se igualmente que no caso do material utilizado as condições de processamento não induzem qualquer alteração química e que do ponto de vista da citotoxicidade induzida a resposta foi bastante boa ao observar-se uma viabilidade celular superior a 80%

## 5.2 Trabalhos Futuros

Os trabalhos a desenvolver no futuro dizem respeito ao sistema Bioextruder propriamente dito e a análise dos *scaffolds* por ele produzidos. Ao nível do sistema Bioextruder deverá procede-se no futuro a:

- Implementação do sistema de esterilização;
- Implementação do sistema do tipo revolver para processamento multi-material;
- Adaptação do software para processamento de *scaffolds* multi-material. A este nível o formato STL poderá vir a ser substituído por uma formato mais versátil desenvolvido na Universidade de Stanford nos EUA designado por PLY (Polygon File Format).

Ao nível dos *scaffolds* deverá proceder-se no futuro a:

- Produção de *scaffolds* multi-material com diferentes níveis de porosidade e diferentes diâmetros de filamento;

- Avaliação do desempenho mecânico dos *scaffolds* função da sua arquitectura de poros e nível de porosidade;
- Avaliação do efeito das condições de processamento (temperatura de fusão, velocidade de varrimento, distancia entre o bico de deposição e a zona de construção, etc.) sobre as características mecânicas e biológicas dos *scaffolds*;
- Estabelecimento de uma correlação entre condições de processamento, características dos *scaffolds* (porosidade, geometria de poro, distribuição de poros, etc.) sobre o processo de adesão, proliferação e diferenciação celular.

## Referências

- Almeida, H.A. (2006), "Design e optimização de *scaffolds* por mecânica computacional para engenharia de tecidos", Tese de Mestrado, Instituto Superior Técnico
- Alves, N.M. e Bártolo, P.J. (2006), "Integrated computational tools for virtual and physical automatic construction", *Automation in Construction*, 15, 257-271
- Atala, A. (2007), "Engineering tissues, organs and cells", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 83-96
- Azhari, H., Rosenthal, S. e Montag, A. (2003), "Implementation of helical computed tomography in magnetic resonance imaging", *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 18, 478-486
- Bártolo, P.J. (2001), "Optical approaches to macroscopic and microscopic engineering", Tese de doutoramento, Universidade de Reading
- Bártolo, P.J. (2007), "Photo-curing modelling: direct irradiation", *International Journal of Advanced Manufacturing Technology*, 32, 480-491.
- Bártolo, P.J. (2008), Comunicação privada
- Bártolo, P.J. e Gaspar, J. (2008), "Metal filled resin for stereolithography metal part", *CIRP Annals – Manufacturing Technology*, 57, 235-238
- Bártolo, P.J. e Jardini, A.L. (2004), "Stereolithographic Processes: Materials, Techniques and Applications", *Proceedings of the 10th European Forum on Rapid Prototyping*, Paris, França.
- Bártolo, P.J., Almeida, H., Rezende, R., Laoui, T. e Bidanda, B. (2007), "Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering," em *Virtual Prototyping & Bio-manufacturing in Medical Applications*, Editado por B. Bidanda e P.J. Bártolo, Springer

Bártolo, P.J., Mendes, A. e Jardini, A. (2004), “Bio-manufacturing” em Design and Nature II – Comparing Design in Nature with Science and Engineering, Editado por C.A. Brebbia, L. Sucharov e P. Pascolo, WIT Press, Southampton, UK

Bell, E. (2000), “Tissue engineering in perspective”, em Principles of Tissue Engineering, Editado por R.P. Lanza, R. Langer e J. Vacanti, Academic Press

Bhatia, S.N., Tsang, V.L. e Albrecht, D.R. (2005), “Three dimensional cell patterned biopolymer scaffolds and method of making the same” Patente Norte Americana nº 2005/0169962.

Boland, T., Tao, X., Damon, B.J., Manley, B. e Kesari, P. (2008), “Drop-on-demand printing of cells and materials for designer tissue constructs”, Materials Science and Engineering C (disponível online)

Carrión, A. (1997), “Technology forecast on ink-jet head technology applications in rapid prototyping”, Rapid Prototyping Journal, 3, 99-115.

Chao, E.Y.S. (2007), “Bone structure and biomechanical analyses using imaging and simulation technology” em Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffolds Materials – Techniques and Applications, Editado por L. Qin, H.K. Genant, J.F. Griffith e K.S. Leung, Springer

Choi, S.H., Kwok, K.T. (2002), “A tolerant slicing algorithm for layered manufacturing”, Rapid Prototyping Journal, 8, 161-179

Chu, T.-M.G., Halloran, J.W., Hollister, S.J. e Feinberg, S.E. (2001), “Hydroxyapatite implants with designed internal architecture”, J Mater Sci: Mater Med, 12, 471-478.

Chua, C.C., Leong, K.F. e Lim, C.S. (2003), “Rapid prototyping: principles and applications”, World Scientific Publishing Company

Colaço, B., Ferreira, D., Gozalo-Ordén e Lacilla, J.M.V. (2003), “A aplicação da ressonância magnética no estudo anatómico do encéfalo de cães”, Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 93, 159-165

Crump, S.S. (1990), "Apparatus and Method for Creating Three-Dimensional Objects", Patente europeia nº 0833237A2.

Daar, A.S. e Greenwood, H. (2007), "A proposed definition of regenerative medicine", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 1, 179-184

Dambacher, M.A., Neff, M., Radspieler, H.R., Ruegsegger, P. e Qin, L. (2007), "In-vivo bone mineral density and structures in humans: from isotom over densiscan to xtreme-CT" em *Advanced Bioimaging Technologies in Assessment of the Quality of Bone and Scaffolds Materials – Techniques and Applications*, Editado por L. Qin, H.K. Genant, J.F. Griffith e K.S. Leung, Springer

Deckard, C.R. (1986), "Method and apparatus for producing parts by selective sintering", Patente Norte Americana, nº 4 863 538

Dolenc, A. e Makela, I. (1994), "Slicing procedures for layered manufacturing techniques", *Computer Aided Design*, 26, 119-126

Ellis, M., Jarman-Smith, M. e Chaudhuri, J.B. (2005), "Bioreactor systems for tissue engineering: a four-dimensional challenge" em *Bioreactors for Tissue Engineering – Principles, Design and Operation*, Editado por J. Chaudhuri e M. Al-Rubeai, Springer

Enderle, J.D., Blanchard, S.M. e Bronzino, J.D. (2005), "Introduction to biomedical engineering", Academic Press

Endo, M. (2005), "Recent progress in medical imaging technology", *Systems and Computers in Japan*, 3, 1-17

Freed, L.E. e Novakovic, G.V. (2000), "Tissue engineering bioreactors", em *Principles of Tissue Engineering*, Editado por R.P. Lanza, R. Langer e J. Vacanti, Academic Press

Griffith, M.L. e Halloran, J.W. (1996), "Freeform fabrication of ceramics via stereolithography", *J. Am Ceram Soc*, 79, 2601-2608.

Hao, L., Savalani, M.M. e Harris, R.A. (2005), "Layer manufacturing of polymer/bioceramic implants for bone replacement and tissue growth", em Virtual Modeling e Rapid Manufacturing – Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping, Editado por P.J. Bártolo et al, Taylor&Francis

Heinzl, J. e Hinz, C.H. (1984), "Ink-jet Printing", Advances in Electronics and Electron Physics, 65, 91-99.

Hull, C.W. (1986), "Apparatus for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography", Patente Norte Americana, nº 4 575 330.

Hull, C.W. (1990), "Method for Production of Three-Dimensional Objects by Stereolithography", Patente Norte Americana nº 4 929 402.

Hutmacher, D.H., Sittering, M. E Risbud, M. (2004), "Scaffold-based tissue engineering rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems", Trends in Biotechnology, 22, 354-362

Hutmacher, D.W., Hoque, m.E. e Wong, Y.S. (2007), "Design, fabrication and physical characterization of scaffolds made from biodegradable synthetic polymers in combination with RP systems based on melt extrusion," em Virtual Prototyping & Bio-manufacturing in Medical Applications, Editado por B. Bidanda e P.J. Bártolo, Springer

Hutmacher, D.W., Schantz, T., Zein, I., Ng, K.W., Teoh, S.H. e Tan, K.C. (2001), "Mechanical properties and cell cultural response of polycaprolactone scaffolds designed and fabricated via fused deposition modelling", J Biomed Mater Res, 55, 203-216

Ikada, A. (2006), "Tissue engineering – fundamentals and applications", Academic Press

Jardini, A.L., Maciel, R., Scarparo, M.A., Andrade, S.R. e Moura, L.F. (2003), "The Development in Infrared Stereolithography Using Thermosensitive Polymers", Advanced Research in Virtual and Rapid Prototyping, Editado por Bártolo et al, Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Leiria.

Jardini, A.L., Maciel, R., Scarparo, M.A., Andrade, S.R. e Moura, L.F. (2004), "Advances in Stereolithography: A New Experimental Technique in the Production of a Three-Dimensional Plastic Model with an Infrared Laser", *Journal of Applied Polymer Science*, 92, 2387-2394.

Kim, S.S., Utsunomiya, H., Koski, J.A., Wu, B.M., Cima, M.J., Sohn, J., Mukai, K., Griffith, L.G. e Vacanti, J.P. (1998), "Survival and function of hepatocytes o a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffolds with an intrinsic network of channels", *Ann Surg*, 228, 8-13.

Lam, C.X.F., Mo, X.M., Teoh, S.H. e Hutmacher, D.W. (2002), "Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer", *Mater Sci. Eng.*, 20, 49-56.

Langer, R. e Vacanti, J.P. (1993), "Tissue Engineering", *Science*, 920-926

Lee, G. e Barlow, J.W. (1996), "Selective laser sintering of bioceramic materials for implants", *Proceedings of the '96 SFF Symposium*, Austin, TX

Lee, J.W., Lan, P.X., Kim, B., Lim, G. e Cho, D., (2007), "3D scaffold fabrication with PPF/DEF using micro-stereolithography" *Microelectronic Engineering*, 84, 1702–1705

Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K. (2003), "Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs", *Biomaterials*, 24, 2363-2378

Levy, R.A., Chu, T.G.M., Holloran, J.W., Feinberg, S.E. e Hollister, S. (1997), "CT-generated porous hydroxyapatite orbital floor prosthesis as a prototype bioimplant", *Am J Neuroradiol*, 18, 1522-1525.

Li, L., Zhuo, X. (2008), "Multi-nozzle low-temperature deposition system of construction of gradient tissue engineering scaffolds", *Journal of Biomedical Materials Research: Part B – Applied Biomaterials* (no prelo)

Limpanuphap, S. e Derby, B. (2002), "Manufacture of biomaterials by a novel printing process", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13, 1163-1166.

Marsan, A.L., Kumar, V., Dutta, D. e Pratt, M.J. (1998), "An assessment of data requirements and data transfer formats for layered manufacturing", National Institute of Standards and Technology, Estados Unidos da América

Matias, J. (2007), "Simulação e optimização computacional de processos estereolitográficos", Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro

Matsuda, T. e Mizutani, M. (2002), "Liquid acrylate-endcapped poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-trimethylene carbonate). II. Computer-aided stereolithographic microarchitectural surface photoconstructs", *J Biomed Mater Res*, 62, 395-403.

Miranda, P., Saiz, E., Gryn, K. e Tomsia, A.P. (2006), "Sintering and robocasting of  $\beta$ -tricalcium phosphate scaffolds for orthopaedic applications", *Acta Biomaterialia*, 2, 457-466

Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. e Markwald, R.R. (2003), "Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering", *Trends in Biotechnology*, 21, 157-161

Mironov, V., Boland, T., Trusk, T., Forgacs, G. e Markwald, R.R. (2003), "Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering", *Trends in Biotechnology*, 21, 157-161

Morsi, Y.S., Wong, C.S. e Patel, S.S. (2007), "Virtual prototyping of biomanufacturing in medical applications," em *Virtual Prototyping & Bio-manufacturing in Medical Applications*, Editado por B. Bidanda e P.J. Bártolo, Springer

NSF Report (2007), "Advancing tissue science and engineering", National Science and Technology Council, Committee on Science, Subcommittee on Biotechnology, Multi-agency Tissue Engineering Science (MATES) Interagency Working Group, Estados Unidos da América



Park, A., Wu, B. e Griffith, L.G. (1998), "Integration of surface modification and 3D fabrication techniques to prepare patterned poly(L-lactide) substrates allowing regionally selective cell adhesion", J Biomater Sci-Polym E, 9, 89-110

Pisco, J.M. e Sousa, L.A. (1999), "Noções fundamentais de imagiologia", Lidel – Edições Técnicas

Pitt, C.G., Chaasalow F.I., Hibionada Y.M., Klimas D.M. e Schindler A. (1981), "Aliphatic Polyesters I: The degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in vivo", Journal of Applied Polymer Science, 26, 3379-3787

Pomerantz, I., Cohen-Sabban, J., Bieber, A., Kamir, J., Katz, M. e Nagler, M. (1990), "Three Dimensional Modelling Apparatus", Patente Norte Americana nº 4961154.

Pomerantz, I., Gilad, S., Dollberg, Y., Ben-Ezra, B., Sheinman, Y., Barequet, G., Nagler, M., Bieber, A. e Katz, M. (1991), "Three Dimensional Modelling Apparatus", Patente Norte Americana nº 5031120.

Rotter, N., Bucheler, M., Haisch, A., Wollenberg, B. e Lang, S. (2007), "Cartilage tissue engineering using resorbable *scaffolds*", Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 1, 411-416

Sachlos, E., Reis, N., Ainsley, C., Derby, B. e Czernuszka, J.T. (2003), "Novel collagen scaffolds with predefined internal morphology made by solid freeform fabrication", Biomaterials, 24, 1487-1497

Sachs, E.M., Haggerty, J.S., Cima, M.J. e Williams, P.A. (1993), "Three-dimensional Printing Techniques", Patente Norte Americana nº 005204055

Sachs, E.M., Haggerty, J.S., Cima, M.J. e Williams, P.A. (1994), "Three-dimensional Printing Techniques", Patente Norte Americana nº 005340656

Saiz, E., Gremillard, L., Menendez, G., Miranda, P., Gryn, K e Tomsia, A.P. (2007), "Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds", Materials Science and Engineering C, 27, 546-550

Sakas, G. (2002), "Trends in medical imaging from 2D to 3D", *Computer&Graphics*, 26, 577-587

Schmid, S.R., Niebur, G.L. e Roeder, R.K. (2005), "Bone and tissue scaffolding and method for producing same" Patente Norte Americana nº 2005/0100578.

Sun, S.H., Chiang, H.W. e Lee, M.I. (2007), "Adaptive direct slicing of a commercial CAD model for use in rapid prototyping", *Int J Adv Manuf Technol*, 34, 689-701

Sun, W., Starly, B., Nam, J. e Darling, A. (2005), "Bio-CAD modelling and its applications in computer-aided tissue engineering", *Computer-Aided Design*, 37, 1097-1114

Taboas, J.M., Maddox, R.D., Krebsbach, P.H. e Hollister, S.J. (2003), "Indirect solid free form fabrication of local and global porous biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds", *Biomaterials*, 24, 181-194.

Tsang, V.L., Bhatia, S.N. (2006), "Fabrication of three-dimensional tissues", *Adv Biochem Engin/Biotechnol*, 103, 189-205

Varghese, D., Deshpande, M., Xu, T., Kesari, P., Ohri, S. e Boland, T. (2005), "Advances in tissue engineering: cell printing", *Thoracic and Cardiovascular Surgery* 129, 470-472

Venuvinod, P.K. e Weiyin, M. (2004), "Rapid Prototyping – Laser-based and Other Technologies", Kluwer Academic Publishers

Vozzi, G., Flaim, C., Ahluwalia, A. e Bhatia, S. (2003), "Fabrication of PLGA scaffolds using soft lithography and microsyringe deposition", *Biomaterials*, 24, 2533-2540

Wang, F., Shor, L., Darling, A., Khalil, S., Güçeri, S. e Lau, A. (2004), "Precision deposition and characterization of cellular poly- $\epsilon$ -caprolactone tissue scaffolds", *Rapid Prototyping Journal*, 10, 42-49.

Wicker, R., Medina, F., Arcaute, K., Ochoa, L., Elkins, C e Mann, B. (2006), "Hydrogel constructs using stereolithography" Patente Norte Americana nº 2006/0237880.

Williams, J.M., Adewunmi, A., Schek, R.M., Flanagan, C.L., Krebsbach, P.H., Feinberg, S.E., Hollister, S.J. e Das, S. (2005) "Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering", *Biomaterials*, 26, 4817-4827

Woodfield, T.B.F., Malda, J., de Wijn, J., Péters, F., Riesle, J. e van Blitterswijk, C.A. (2004), "Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique", *Biomaterials*, 25, 4149-4161.

Woodward S.C., Brewer P.S. e Moatamed F., (1985), "The intracellular degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)", *Journal of Biomedical Materials Research*, 19, 437-444,.

Xiong, Z., Yan, Y., Zhang, R. e Sun, L. (2001), "Fabrication of porous poly(L-lactide acid) scaffolds for bone tissue engineering via precise extrusion", *Scripta Materialia*, 45, 773-779

Xiong, Z., Yan, Y., Zhang, R. e Wang, X. (2005), "Organism manufacturing engineering based on rapid prototyping principles", *Rapid Prototyping Journal*, 11, 160-166

Yeong, W.Y., Chua, C.K., Leong, K.F. e Chandrasekaran, M. (2004), "Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential", *Trends in Biotechnology*, 22, 643-652

Yousef, W.J., Thiele, E.S. e Scuisato, D.L. (1999), "Correlação diagnóstico da ressonância magnética com artroscopia nas lesões intra-articulares do joelho", *Revista Brasileira de Ortopedia*, 34, 375-380

Zein, I., Hutmacher, D.W., Tan, K.C. e Teoh, S.H. (2002), "Fused deposition modeling of novel scaffolds architectures for tissue engineering applications", *Biomaterials*, 23, 1169-1185.

Zeltinger, J., Sheerwood, J.K., Graham, D.M., Mueller, R. e Griffith, L.G. (2001), "Effects of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition", *Tissue Engineering*, 7, 557-572

Zhou, M.Y., Xi, J.T. e Yan, J.Q. (2004), "Adaptive direct slicing with non-uniform cusp heights for rapid prototyping", *Int J Adv Manuf Technol*, 23, 20-27, 2004